

Aus dem Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

Autoantikörper:

Induktion durch polyklonal aktivierte T-Zellen und
Modulation in der Epidermolysis bullosa acquisita

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

– aus der Sektion Naturwissenschaften –

vorgelegt von

David Michael Banczyk

aus Hindenburg

Lübeck 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Marc Ehlers

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Juni 2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 11. Juni 2013

„Nichts auf der Welt ist so kompliziert, dass es sich nicht auch in einfachen Worten wiedergeben ließe.“

Prof. Dr. Günter M. Ziegler

Öffentlicher Vortrag mit dem Titel: „Ist das noch Wissenschaft, wenn man's der Öffentlichkeit erklären kann? - Leider schwierig!“
beim 5. Lübecker Doktorandentag in der St. Petri Kirche in Lübeck, 18. Mai 2011

Für Lin

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis	iv
1 Einleitung	1
1.1 Die Entstehung eines Keimzentrums	5
1.1.1 Der erste Kontakt zwischen einer T- und B-Zelle.....	6
1.1.2 Bildung eines Keimzentrums im Follikel	9
1.1.3 Der zweite Kontakt zwischen einer T- und B-Zelle	9
1.2 T-zellvermittelte Induktion von Autoimmunerkrankungen	10
1.3 Fragestellung.....	11
2 Materialien und Methoden	13
2.1 Materialien.....	13
2.1.1 Tiere.....	13
2.1.2 Antikörper.....	13
2.1.3 Medien und Puffer.....	14
2.1.4 Chemikalien und andere Reagenzien	15
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	17
2.1.6 Operationsmaterialien.....	18
2.1.7 Kits	19
2.1.8 Oligonukleotide	19
2.1.9 Geräte	20
2.1.10 Software	21
2.2 Methoden	23
2.2.1 Zellbiologische Methoden	23
2.2.2 Tierversuche	24
2.2.3 Immunbiologische Methoden	27
2.2.4 Immunhistologische Methoden.....	30

2.2.5	Digitale Bildanalyse zur Auswertung der histologischen Präparate	33
2.2.6	Molekularbiologische Methoden.....	34
2.2.7	Proteinbiochemische Methoden	35
2.2.8	Statistische Auswertung	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Untersuchung der Keimzentrumsbildung im Mausmodell	41
3.1.1	Induktion von Keimzentren durch Transfer <i>in vitro</i> aktivierter Lymphozyten.....	41
3.1.2	Entstehung T-zellabhängiger Keimzentren.....	46
3.1.3	Keimzentren sind von der Vitalität der transferierten Zellen abhängig.....	48
3.1.4	T-Zellen mit begrenztem T-Zellrezeptorrepertoire induzieren eine Keimzentrumsreaktion.....	50
3.1.5	Produktion von Autoantikörpern durch Transfer <i>in vitro</i> aktivierter Lymphozyten.....	52
3.1.6	CD154-unabhängige Aktivierung der B-Zellen mit anschließender CD154-abhängigen Bildung von Keimzentren.....	53
3.1.7	Zusammenfassung zum Mechanismus der Keimzentrumsbildung.....	59
3.2	Modulation einer Autoimmunkrankheit.....	60
3.2.1	Vorbehandlung verhindert die Epidermolysis bullosa acquisita.....	60
3.2.2	IgG1-Antikörpertiter sind im Blut gesunder Tieren nicht erhöht	65
3.2.3	Vergleichbare Autoantikörper- und Komplementbindung an dermo-epidermaler Junktionszone	67
3.2.4	Keine Veränderung der Autoantikörper Fc-Sialylierung durch schützende Vorbehandlung	69
3.2.5	Vorbehandlung mit Ovalbumin induzierte im Lymphknoten ein T _H 2-Milieu	70
3.2.6	Zusammenfassung der Modulation der Epidermolysis bullosa acquisita.	72
4	Diskussion	73
4.1	Transfer <i>in vitro</i> aktivierter Lymphozyten induziert <i>in vivo</i> eine Keimzentrumsreaktion	73

4.2 T-Zellen stimulieren B-Zellen MHC-Klasse-II-unabhängig zur Keimzentrumsbildung und Produktion von Autoantikörpern	74
4.3 CD154 wird nicht bei der Aktivierung von B-Zellen benötigt, ist aber essentiell für die Keimzentrumsbildung	76
4.3.1 Das neue Zweischnittmodell der Keimzentrumsbildung.....	78
4.4 Modulierende Vorbehandlung schützt vor Epidermolysis bullosa acquisita ohne die schützenden IgG1-Autoantikörper zu erhöhen	80
4.5 Induzierter Schutz korreliert nicht mit der Fc-Sialylierung der Autoantikörper	82
4.6 Vorbehandlung induziert unterschiedliche T-Helferzellen	83
5 Zusammenfassung.....	87
Literaturverzeichnis	89
Abbildungsverzeichnis	105
Tabellenverzeichnis	107
A) Ergänzende Daten.....	I
B) Danksagung	VII
C) Publikationen.....	VIII
D) Erklärung	IX

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A, Alum	Aluminiumhydroxid
Abb.	Abbildung(en)
Alexa Fluor 647	Alexa Fluoreszenzfarbstoff mit Anregungsmaximum 647 nm
AP	Alkalische Phosphatase
APC	<i>Antigen presenting cell</i> (antigenpräsentierende Zelle)
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase
AUC	<i>Area under the curve</i> (Fläche unter dem Kurvenverlauf)
bp	Basenpaar(e)
BZ	B-Zellzone
CC	Cystein-Cystein (Aminosäuresequenz)
CCR	CC Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CXC	Cystein-X-Cystein (Aminosäuresequenz)
CXCL	CXC Chemokinrezeptorligand
CXCR	CXC Chemokinrezeptor
DC	Dendritic cell (Dendritische Zelle)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEJ	dermo-epidermale Junktionszone
DIF	direkte Immunfluoreszenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	Doppelstrang
DTH	Delayed-type hypersensitivity (verzögerte zellvermittelte Überempfindlichkeitsreaktion)
DTT	Dithiothreitol
EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
FTY720	Fingolimod (2-Amino-2-(2-(4-octylphenyl) ethyl) propan -1,3-diol)
g	Gravitation (Einheit)
GC	<i>Germinal center</i> (Keimzentrum)
GZ	Gedächtniszelle
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde (Einheit)
HKG	<i>Housekeeping gene</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IFF	Indirekte Immunfluoreszenz
IFN γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
kDa	Kilo-Dalton
Ki-67	Kiel-67 (Proliferationsmarker)
Lm., L. major	<i>Leishmania major Promastigote</i> , Stamm MHOM/IL/81/FE/BNI
mCol7C-GST	Fragment des murinen Kollagen-Typ-VII mit GST-Tag
mAK	Monoklonaler Antikörper
MACS	<i>Magnetic Cell Sorting</i> (Magnetische Zellsortierung)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute (Einheit)
mg	Milligramm (Einheit)
ml, μ l	Milliliter, Mikroliter (Einheit)
MLN51	<i>Metastatic Lymph Node Gene 51</i> (HKG)
mm, μ m, nm	Millimeter, Mikrometer, Nanometer (Einheit)
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
OVA	Ovalbumin
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PZ	Plasmazelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactiv oxygen species)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde (Einheit)
SAP	SLAM-assoziiertes Protein
s.c	<i>Subcutaneous</i> (subkutan)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SLAM	Signalübertragendes Lymphozytenaktivierungsmolekül
SSC	<i>Side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle(n)
TCR	<i>T cell receptor</i> (T-Zellrezeptor)
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TM	Titermax
TMB	3,3',5,5' Tetramethylbenzidine
TZ	T-Zellzone
ün	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute

1 EINLEITUNG

Autoimmunkrankheiten nehmen in den westlichen Ländern eine immer bedeutendere Rolle ein. Seit den 1950er Jahren steigt die Inzidenz stetig an (Bach, 2002). Als häufigste Ursache für die Entstehung gelten die genetische Prädisposition sowie das Einwirken äußerer Faktoren (Rioux and Abbas, 2005). Etwa 5 % der Bevölkerung westlicher Länder sind von den etwa 70 am häufigsten auftretenden Autoimmunkrankheiten betroffen (Tobón et al., 2011). Sie unterscheiden sich im Angriff verschiedener Zielgewebe sowie im Alter der Patienten bei Krankheitsausbruch. Sie sind gegenwärtig noch nicht heilbar, weisen meist einen chronischen Verlauf auf und ihre Behandlung ist daher auf eine Linderung der Symptome ausgerichtet. Allen gemein ist jedoch die Beteiligung der angeborenen und/oder adaptiven Immunantwort, die zu Gewebeschädigungen führt (Rose and Bona, 1993; Lernmark, 2001; Leo et al., 2010). Einige Autoimmunkrankheiten zeichnen sich durch Autoantikörper aus. Dabei können die Autoantikörper Monate oder sogar Jahre vor dem Ausbruch erster Krankheitssymptome im betroffenen Patienten nachgewiesen werden (Arbuckle et al., 2003). Diese sind gegen zelluläre Bestandteile wie DNA, Kernproteine oder funktionelle Zellbestandteile (Rezeptoren) oder gegen extrazelluläre Bestandteile wie Strukturproteine gerichtet. Die Bindung der Autoantikörper führt zu einer Aktivierung der zellulären Immunantwort und der damit verbundenen Verletzung und Zerstörung des Zielgewebes (Robbins et al., 1957; Nielen et al., 2004; Sitaru and Zillikens, 2005; Rahman and Isenberg, 2008).

Die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) ist eine seltene, aber klinisch schwer verlaufende Autoimmunerkrankung der Haut und der Schleimhäute (der Augen, der Nase und des Munds). Sie zeichnet sich durch subepidermale Blasen aus, die durch zirkulierende und gewebsgebundene Autoantikörper induziert werden (Woodley et al., 1984; Lapiere et al., 1993; Ishii et al., 2010). Die Autoantikörper sind gegen die NC1-Domäne des Strukturproteins Kollagen-Typ-VII gerichtet (Woodley et al., 1984, 1988). Dabei handelt es sich um die Ankerfibrillen, die die Basalmembran der Epidermis mit der darunter liegenden Dermis verbinden. Die Blasen heilen mit Milien- und Narbenbildung ab (Woodley et al.,

1991). Mit der direkten Immunfluoreszenz von periläsionaler Haut kann eine lineare Ablagerung von Autoantikörpern an der dermo-epidermalen Junktionszone (DEJ) nachgewiesen werden (Yaoita et al., 1981).

Die Epidermolysis bullosa acquisita eignet sich hervorragend als Modellerkrankung einer antikörpervermittelten Autoimmunerkrankung. Zum einen lässt sich der pathogene Krankheitsverlauf ausgezeichnet charakterisieren, da die Haut sehr gut zugänglich ist und direkt untersucht werden kann. Zum anderen ist das Antigen der Epidermolysis bullosa acquisita identifiziert. Dadurch lässt sich die Krankheit im Tiermodell durch eine Immunisierung mit dem rekombinanten murinen Fragment der NC1-Domäne von Kollagen-Typ-VII (mCol7C-GST) (aktives Modell) nachahmen. Versuchstiere entwickeln einen zu bei Patienten beobachteten ähnlichen Phänotyp (Sitaru et al., 2006). Die pathogene Bedeutung der Autoantikörper in der Epidermolysis bullosa acquisita konnte *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. So induzieren aus EBA-Patienten isolierte pathogene Autoantikörper in Anwesenheit von Neutrophilen in Kryoschnitten von gesunder humaner Haut eine Spaltbildung zwischen der Epidermis und der Dermis (Sitaru et al., 2002). Auch der intravenöse Transfer von pathogenen Autoantikörpern aus Kaninchen oder Mensch induziert in der Maus einen EBA-ähnlichen Phänotyp (Sitaru et al., 2005; Chen et al., 2007).

Die Pathogenese der Epidermolysis bullosa acquisita zeichnet sich durch die Bindung der Autoantikörper an ihr Zielantigen in der Haut aus (**Abb. 1–1**). Immunglobuline (IgG) von EBA-Patienten lagern sich an die dermo-epidermale Junktionszone, aktivieren das Komplement und führen zu einer Infiltration von Leukozyten (Gammon et al., 1984). Im Mausmodell führt die Krankheitsinduktion in Tieren des verwendeten SJL-Mausstamms zu einer vermehrten Produktion von Autoantikörpern der IgG2-Subklasse. Diese aktivieren im Gegensatz zu IgG1-Autoantikörpern das Komplement (Klaus et al., 1979; Sitaru et al., 2005, 2006; Hammers et al., 2011). Ihre Deposition an die dermo-epidermale Junktionszone aktiviert den alternativen Komplementsignalweg, und führt damit zum Ausbruch der Krankheit (Sitaru et al., 2002; Mihai et al., 2007).

Antikörper der IgG-Subklasse bestehen aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Huber et al., 1976). Ihre Struktur kann in zwei funktionelle Gruppen unterteilt werden. Über ihr F(ab)₂-Fragment (antigen binding fragment) binden sie spezifisch mit hoher Affinität ihr Antigen. Das Fc-Fragment (crystalizable fragment) bindet die auf Leukozyten exprimierten

Fc γ -Rezeptoren und vermittelt ein entsprechendes Signal (Franklin, 1975). Kollagen-Typ-VII-spezifische Autoantikörper binden über das F(ab) $_2$ -Fragment ihr Zielantigen. Der Transfer isolierter F(ab) $_2$ -Fragmente pathogener Autoantikörper führt zu einer Ablagerung an die dermo-epidermale Junktionszone, jedoch bleibt nach Transfer dieser F(ab) $_2$ -Fragmente der EBA-Phänotyp aus. Die Komplementkaskade wird nicht aktiviert (Sitaru et al., 2002, 2005). Die Aktivierung des Komplements erfolgt nur nach Transfer vollständiger Autoantikörper über das Fc-Fragment. Durch das Komplement werden neutrophile Granulozyten angelockt (Sitaru et al., 2002; Chiriac et al., 2007). Die folgende Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies leiten eine Gewebeschädigung ein (Witko-Sarsat et al., 2000; Chiriac et al., 2007).

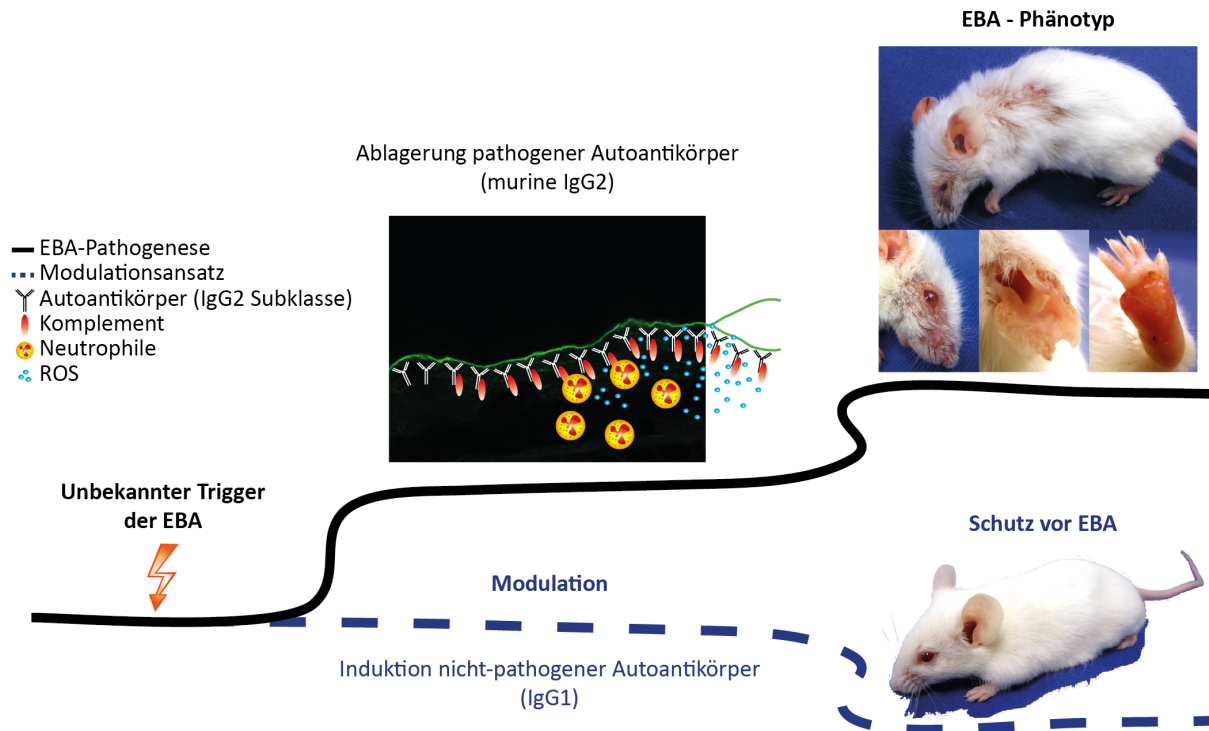


Abb. 1–1: Die Pathogenese der Epidermolysis bullosa acquisita mit Modulationsansatz. Ein unbekannter Trigger (im Tiermodell simuliert durch Immunisierung mit einem rekombinanten Fragment des murinen Kollagen-Typ-VII im Adjuvans Titermax) führt zur Bildung pathogener Autoantikörper. Nach Ablagerung an die dermo-epidermale Junktionszone (DEJ) in der Haut wird das Komplement aktiviert und eine Einwanderung von Neutrophilen wird eingeleitet. Die aktivierten Neutrophilen setzen reaktive Sauerstoffspezies frei. Es kommt zur Gewebeschädigung in Form von Spaltbildung und dem EBA-Phänotyp (Krusten, Haarausfall, Läsionen). Ein Weg der Modulation ist die Induktion von Autoantikörpern der IgG1-Subklasse, die nicht das Komplement aktivieren. Auf diese Weise kann ein Schutz vor dem Ausbruch der Krankheit erzielt werden.

Die Behandlung der Epidermolysis bullosa acquisita ist anspruchsvoll, da das ursächliche Selbstantigen nicht beseitigt werden darf (Engineer and Ahmed, 2001). Aufgrund der niedrigen Inzidenz von weniger als 0,3 Neuerkrankungen pro Million Einwohner in Europa gibt es in der Literatur keine großen klinischen Studien, sondern Fallbeschreibungen mit der

Anwendung bestimmter Medikamente (Bernard et al., 1995; Kim et al., 2011). Zur symptomatischen Behandlung werden Immunsuppressiva wie Ciclosporin oder Colchicin sowie systemisch wirkende Corticosteroide eingesetzt (Arora et al., 2005; Remington et al., 2008; Kim et al., 2011). Des Weiteren werden EBA-Patienten mit intravenös verabreichten Immunglobulinen (IVIg) behandelt oder einer Plasmapherese zur Beseitigung der zirkulierenden Autoantikörper unterzogen (Furie et al., 1986; Kofler et al., 1997; Engineer and Ahmed, 2001). Auch eine Depletion der B-Zellen durch Rituximab (monoklonaler anti-CD20 Antikörper) wird als Behandlung der Epidermolysis bullosa acquisita beschrieben (Niedermeier et al., 2007). Letztere Behandlungsansätze heben sich ab. Ihnen gemein ist die Reduzierung der pathogenen Wirkung der zirkulierenden Autoantikörper. Insgesamt sind diese Behandlungsansätze jedoch unspezifisch, kosten- und zeitintensiv und gehen vermehrt mit starken Nebenwirkungen einher.

Wie oben aufgeführt, nehmen komplementaktivierende Autoantikörper bei der Pathogenese der Epidermolysis bullosa acquisita eine zentrale Rolle ein. Ziel eines spezifischen Behandlungsansatzes sollte der an das Kollagen-Typ-VII-bindende Autoantikörper sein. Durch eine Modulation der Subklasse zu nicht komplementbindenden Antikörpern der IgG1-Subklasse könnten pathogen wirkende Autoantikörper verdrängt werden. Im Mausmodell wird zur Induktion der Epidermolysis bullosa acquisita das Adjuvans Titermax benutzt (Sitaru et al., 2006). Dabei handelt es sich um ein Block-Copolymer, das sehr gut Antigen und Komplement bindet, chemotaktisch Immunzellen anlockt und Makrophagen aktiviert. Durch seine Stabilität wird das Antigen über einen langen Zeitraum effektiv präsentiert (Bennett et al., 1992; Stills, 2005). Titermax induziert eine vermehrte Produktion komplementbindender Antikörper der IgG2-Subklasse (Cribbs et al., 2003). EBA-resistente Versuchstiere vom BALB/c-Mausstamm zeichnen sich durch eine vermehrte Produktion von IgG1-Autoantikörpern aus (Hammers et al., 2011). Durch die Modulation der Autoantikörpersubklassen bietet sich die Möglichkeit, den pathogenen Krankheitsverlauf zu verändern (**Abb. 1–1**). Das Adjuvans Aluminiumhydroxid induziert eine vermehrte Produktion von IgG1-Antikörpern gegen Proteinantigene und ist für den Menschen zugelassen (Hunter, 2002; Cribbs et al., 2003). Ohne die Antigenspezifität zu verändern, werden nicht komplementaktivierende Autoantikörper der IgG1-Subklasse gebildet (Dangl et al., 1988). Bei erfolgreicher Induktion, können diese Autoantikörper sich an die Haut lagern und die komplementaktivierenden Autoantikörper verdrängen.

Für die Entwicklung einer erfolgreichen und spezifischen Behandlungsmethode ist daher das Verständnis der Entstehung von Antikörpern unabdingbar. Antikörper sind das Produkt des adaptiven Immunsystems. Es zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, zwischen ‚eigen‘ und ‚fremd‘ zu unterscheiden. Dabei ist die immunologische Toleranzentwicklung der Mechanismus, der den Angriff körpereigener Strukturen verhindert. Dieser Prozess unterliegt strengen Kontrollmechanismen, sowohl auf der T- als auch der B-Zellseite (Goodnow et al., 2005). Autoantikörper sind das Resultat des Zusammenbruchs der Toleranz gegen körpereigene Strukturen. Die Ursache dafür ist noch nicht bekannt. Nach Zusammenbruch der Toleranz leisten T-Zellen Hilfe an B-Zellen, so dass diese in Follikel sekundärer lymphatischer Organe einwandern können. Dort angekommen, kommt es in Form einer Keimzentrumsreaktion durch die somatische Hypermutation zur Reifung hochaffiner autoreaktiver Antikörper. In einem Mausmodell zu spontan auftretenden Autoimmunkrankheiten sind parallel zum Ausbruch der Autoimmunkrankheit auch spontan auftretende Keimzentren in der Milz nachzuweisen. Diese korrelieren zeitlich mit dem Auftreten von Autoantikörpern (Luzina et al., 2001).

1.1 Die Entstehung eines Keimzentrums

Die zentrale Funktion in der adaptiven Immunantwort nehmen die T- und B-Zellen ein. Sie zeichnen sich durch ihre Anpassungsfähigkeit, mit einer immer spezifischer werdenden Immunantwort gegen ein Pathogen zu reagieren, aus. Durch gegenseitige Interaktionen zwischen den Zellen der adaptiven Immunantwort und den Zellen des angeborenen Immunsystems (phagozytierende Zellen, wie die neutrophilen Granulozyten und Makrophagen sowie die antigenpräsentierenden Zellen, wie etwa die dendritischen Zellen) wird eine effektive Immunantwort aufgebaut (Delves and Roitt, 2000a, 2000b).

Das Keimzentrum ist hier die Speerspitze des adaptiven Immunsystems. Seine Entstehung lässt sich in zwei Phasen der T-zellvermittelten B-Zellaktivierung unterteilen. Die erste Phase findet im äußeren Bereich der T-Zellzone an der Grenze zum Follikel statt. T-zellvermittelt differenzieren B-Zellen entweder zu kurzlebigen Plasmazellen oder zu keimzentrumsformenden B-Zellen (Ho et al., 1986). Erstere siedeln sich extrafollikulär an und sekretieren schwachaffine Antikörper. Die anderen wandern in den Follikel und bilden ein Keimzentrum. Keimzentren sind Bereiche der sekundären lymphatischen Organe, in denen B-Zellen proliferieren und durch somatische Hypermutation zu hochaffinen,

antikörpersezernierenden B-Zellen heranreifen. Dabei wird ihre Selektion in der zweiten Phase durch folliculäre T-Helferzellen kontrolliert (MacLennan, 1994; Manser, 2004). Die B-Zellen entwickeln sich zu langlebigen Plasmazellen, die hochaffine Antikörper sezernieren, sowie zu Gedächtniszellen, die für eine schnellere und wirkungsvollere Immunantwort bei einer erneuten Infektion sorgen (MacLennan and Gray, 1986; Allen et al., 2007). Vor der Entstehung eines Keimzentrums müssen jedoch T- und B-Zellen, die Epitope des gleichen Antigens erkennen, in Kontakt treten.

1.1.1 Der erste Kontakt zwischen einer T- und B-Zelle

In vivo bekommt eine T-Zelle in der T-Zellzone das prozessierte Antigenpeptid durch eine dendritische Zelle (DC) präsentiert (Miller et al., 2004) (**Abb. 1–2 (1)**). Die dendritische Zelle wurde zuvor im Gewebe außerhalb der sekundären lymphatischen Organe durch Antigenaufnahme aktiviert und zur Produktion von Kofaktoren wie CD80 und CD86 stimuliert. Dadurch wird sie zu einem potenten T-Zellaktivator (Van Kooten and Banchereau, 1997; Banchereau and Steinman, 1998; Delves and Roitt, 2000a). Unter physiologischen Bedingungen werden für die T-Zellaktivierung stets zwei Signale benötigt. Das erste Signal ist die Bindung des T-Zellrezeptors (TCR) an das über *Major Histocompatibility Complex II* (MHC-Klasse-II) präsentierte Antigenpeptid. Gleichzeitig muss der von den T-Zellen exprimierte Kofaktor CD28 seinen Liganden (CD80 und CD86) binden (Christensen et al., 2002; Riley and June, 2005). Die aktivierte T-Zelle proliferiert und verändert ihr Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren. Dies führt zur Wanderung der T-Zelle zum Rand der T-Zellzone (MacLennan et al., 1997; Ansel et al., 1999; Cyster, 2005; Haynes et al., 2007). Zusätzlich synthetisieren diese antigenerfahrenen T-Zellen vorgeformtes CD154 (auch CD40 Ligand (CD40L) genannt), ein essenzielles Signalmolekül von aktivierten CD4⁺ T-Zellen, um B-Zellen zu aktivieren. Kommt es zu einer Kreuzvernetzung des T-Zellrezeptors, so kann aufgrund dessen CD154 innerhalb kürzester Zeit (etwa fünf Minuten nach Stimulation des T-Zellrezeptors) als Signalmolekül an der Zelloberfläche wirken und an das auf B-Zellen konstitutiv exprimierte CD40 binden (Casamayor-Palleja et al., 1995).

Unterdessen wird eine B-Zelle im Follikel nach Erkennung eines Antigens durch den B-Zellrezeptor aktiviert. Die B-Zelle trifft auf das Antigen in gelöster Form oder bekommt es in nativer Form durch eine antigenpräsentierende Zelle (APC) angeboten (Wykes et al., 1998; Huang et al., 2005; Pape et al., 2007) (**Abb. 1–2 (2)**). Das Antigen wird internalisiert,

prozessiert und kann dann wieder über MHC-Klasse-II einer passenden T-Zelle präsentiert werden (Lanzavecchia, 1985). Genau wie in der T-Zelle führt die Antigenaktivierung der B-Zelle zu einer veränderten Expression von Chemokinrezeptoren, wodurch die B-Zellen aus dem Follikel an die Grenze zur T-Zellzone wandern können (Reif et al., 2002; Cyster, 2005; Okada et al., 2005; Vinuesa and Cyster, 2011). In der Grenzzone zwischen T- und B-Zellzone angekommen treffen antigenspezifische T- und B-Zellen aufeinander (**Abb. 1–2 (3)**).

Die B-Zelle kann der T-Zelle über den MHC-Klasse-II-Komplex das spezifische Antigenpeptid präsentieren und auf diese Weise die T-Zelle aktivieren (Rock et al., 1984; Lanzavecchia, 1985; Macaulay et al., 1997). Diese spezifische Zell-Zellinteraktion dauern etwa eine Stunde, während unspezifische Zellkontakte bei unter zehn Minuten liegen (Okada et al., 2005). Durch den Zell-Zellkontakt erhalten die B-Zellen T-Zellhilfe in Form von Zytokinsignalen sowie diversen Kofaktoren, die sie für das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung benötigen (Mills and Cambier, 2003; Elgueta et al., 2009; McHeyzer-Williams et al., 2009). Eine Bindung des auf den B-Zellen exprimierten CD40 senkt den Schwellenwert, um ruhende B-Zellen aktivieren zu können (Wheeler et al., 1993). CD40-vermittelt wird die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 erhöht. Dadurch wird die Effizienz der Zell-Zellinteraktion gesteigert (Ranheim and Kipps, 1993; Yang and Wilson, 1996). Der Eintritt der B-Zelle in den Zellzyklus und damit die klonale Expansion von B-Zellen sowie die humorale Immunantwort ist CD154-abhängig und kann durch einen antagonistischen CD154-Antikörper vollständig inhibiert werden (Foy et al., 1993; Garside et al., 1998). Die Interaktion zwischen der T- und B-Zelle führt zur Proliferation der B-Zelle. Einige B-Zellen wandern in den extrafollikulären Raum und differenzieren dort zu kurzlebigen Plasmazellen, von denen nach etwa drei Tagen die meisten durch Apoptose sterben (Ho et al., 1986; Jacob et al., 1991a; Jacob and Kelsoe, 1992) (**Abb. 1–2 (4)**).

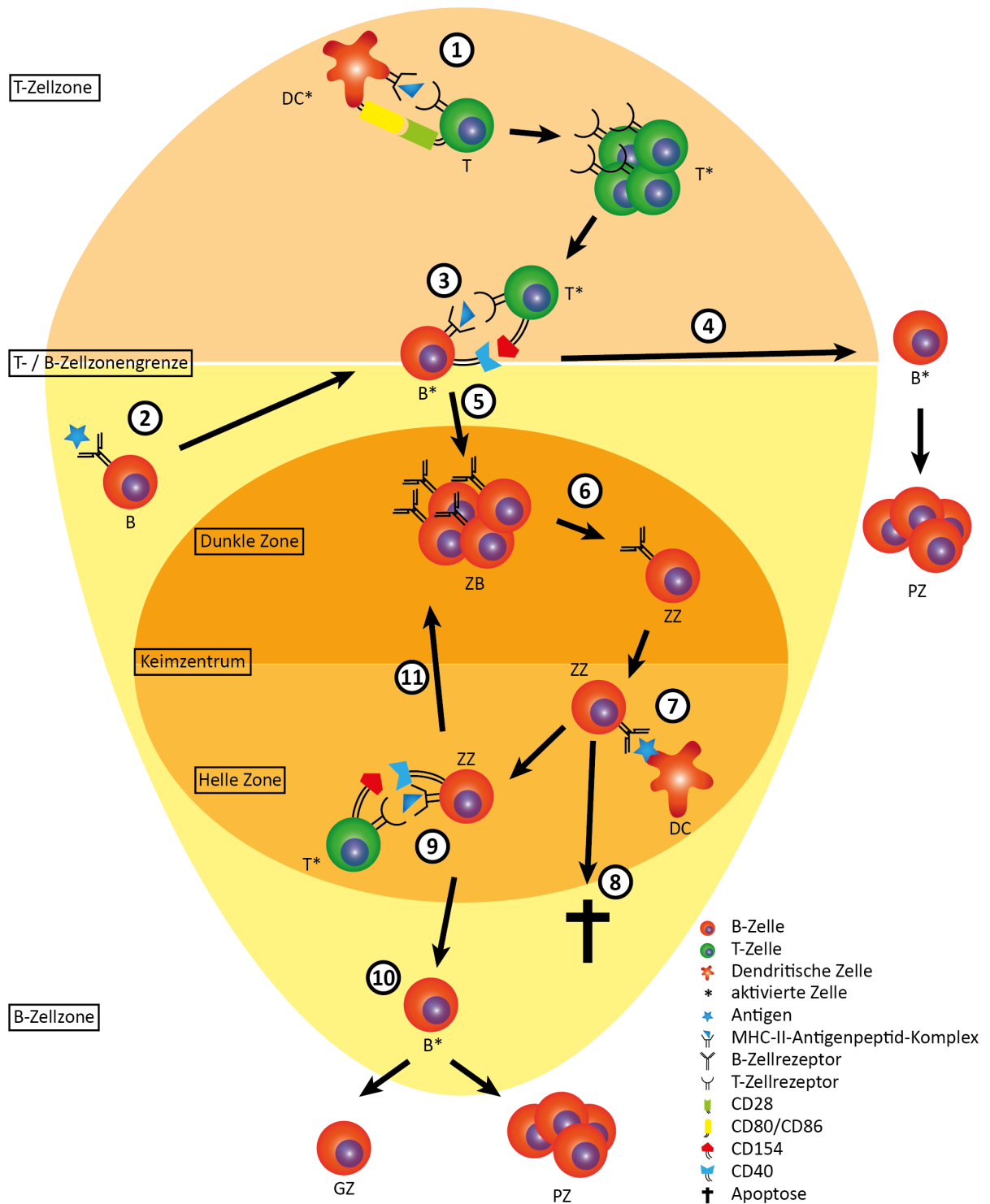


Abb. 1–2: Zellkontakte bei der Bildung einer Keimzentrumsreaktion in sekundärem lymphatischem Gewebe.

1. Aktivierte dendritische Zelle präsentiert T-Zelle über MHC-Klasse-II ein Antigenpeptid; 2. Antigenerkennung durch B-Zelle; 3. Kontakt zwischen antigenspezifischer T- und B-Zelle; 4. Extrafollikuläre Differenzierung der B-Zellen zu kurzlebigen Plasmazellen; 5. Einwanderung der B- und T-Zellen ins Follikel, Bildung des Keimzentrums; 6. Somatische Hypermutation; 7. Kontakt der Zentrozyten zu antigenpräsentierenden dendritischen Zellen; 8. Apoptose durch ausbleibende oder unzureichende T-Zellhilfe; 9. Zellkontakt zu follikulären T-Helferzellen; 10. Differenzierung zu Gedächtniszellen sowie langlebigen Plasmazellen; 11. Rückeintritt in den Zyklus (wiederholte somatische Hypermutation). B: B-Zelle, DC: dendritische Zelle, GZ: Gedächtniszelle, PZ: Plasmazelle, T: T-Zelle, ZB: Zentroblast, ZZ: Zentrozyt.

1.1.2 Bildung eines Keimzentrums im Follikel

Nach dem Zell-Zellkontakt an der Grenze zur T-Zellzone wandern einige B-Zellen gemeinsam mit T-Zellen in den Follikel und bilden dort ein Keimzentrum (Jacob et al., 1991a; MacLennan, 1994; Ansel et al., 1999; Vinuesa and Cyster, 2011) (**Abb. 1–2 (5)**). Die B-Zellen durchlaufen eine exponentielle Proliferation (MacLennan et al., 1990; Liu et al., 1991). Das entstehende Keimzentrum lässt sich aufgrund seiner histologischen Erscheinung in eine dunkle (dichter Zellverband) und eine helle Zone unterteilen. Die B-Zellen innerhalb der dunklen Zone unterstehen einer hohen Proliferationsrate und werden daher auch als Zentroblasten (ZB) bezeichnet (MacLennan, 1994). In den Zentroblasten kommt es durch Aktivierung der somatischen Hypermutation zur Reifung des B-Zellrezeptors (**Abb. 1–2 (6)**). Daraus gehen hochaffine antigenspezifische B-Zellen hervor (Jacob et al., 1991a, 1991b). Nach Differenzierung der Zentroblasten zu nicht proliferierenden Zentrozyten wird durch eine veränderte Expression der Chemokinrezeptoren die Wanderung in die helle Zone reguliert (Liu et al., 1989; Allen et al., 2004). Die helle Zone zeichnet sich durch eine hohe Zahl von follikulären dendritischen Zellen aus (MacLennan, 1994; Hauser et al., 2010). Dabei kommt es zum Zell-Zellkontakt zwischen den gereiften Zentrozyten und den antigenpräsentierenden dendritischen Zellen (Hardie et al., 1993; Hauser et al., 2007) (**Abb. 1–2 (7)**). Dieser Kontakt scheint nicht von langer Dauer zu sein, da sich die B-Zellen mit unverminderter Geschwindigkeit durch das Netzwerk der dendritischen Zellen bewegen (Allen et al., 2007).

1.1.3 Der zweite Kontakt zwischen einer T- und B-Zelle

Auf ihrem Weg durch die helle Zone des Keimzentrums sind die B-Zellen sensibel gegenüber T-Zellhilfe (Victoria et al., 2010). In diesem Entwicklungsstadium exprimieren sie vermehrt CD95 (Fas), wodurch sie programmiert sind, durch Apoptose zu sterben (Hardie et al., 1993; Krammer, 2000) (**Abb. 1–2 (8)**). Die Apoptose kann verhindert werden, wenn sie selektioniert werden und ein Überlebenssignal in einem zweiten Kontakt zur T-Zelle erhalten (Liu et al., 1989; Feuillard et al., 1995). Es findet eine Selektion der B-Zellen abhängig von ihrer Affinität zum Antigen statt. Hochaffine B-Zellen haben im Vergleich mit schwachaffinen B-Zellen im Keimzentrum eine geringere Sterberate bei unveränderter Proliferation (Anderson et al., 2009).

Um T-Zellhilfe möglichst effektiv zu erhalten, wird auf B-Zellen des Keimzentrums, verglichen mit naiven oder Gedächtnis B-Zellen, die Expression von MHC-Klasse-II hochreguliert. Dies weist auf eine besonders effektive Antigenpräsentation an die T-Zellen hin (Glazier et al., 2002). Im sekundären Follikel wird die Keimzentrumsreaktion durch folliculäre T-Helferzellen unterstützt. Zytokine und Zell-Zell-Kontakte vermitteln die erforderliche Hilfe zur Erhaltung von Keimzentren (Breitfeld et al., 2000; King et al., 2008; Elgueta et al., 2009). Folliculäre T-Helferzellen leisten Hilfe in Form von Zytokinen wie Interleukin 4 (IL4) und IL21 sowie durch direkten Zellkontakt über CD154 (MacLennan, 1994; Chtanova et al., 2004; Vinuesa et al., 2005b, 2010) (**Abb. 1–2 (9)**). T-Zellen liefern Signale, die zum Erhalt von Keimzentren beitragen (Vinuesa et al., 2000; Manser, 2004). Dabei ist der direkte Kontakt zwischen T- und B-Zelle von essenzieller Bedeutung. Wird die effiziente Zell-Zellinteraktion wie etwa durch ein Knockout des SLAM- (Signalübertragendes Lymphozytenaktivierungsmolekül) -assoziierten Proteins (SAP) in ihrer Dauer beeinträchtigt, so führt dies unweigerlich zu einer stark eingeschränkten Keimzentrumsreaktion (Ma et al., 2007; Qi et al., 2008). CD154-vermittelt wird in entsprechenden B-Zellen mit hochaffinen B-Zellrezeptoren die Apoptosekaskade gehemmt (Rathmell et al., 1996; Koopman et al., 1997; Liu et al., 1997; Hennino et al., 2000). Außerdem wird der Klassenwechsel in der B-Zelle durch den CD154-CD40-Signalweg induziert. Gemeinsam mit einer Ausschüttung von Zytokinen wird durch die T-Zellhilfe bestimmt, ob etwa komplementaktivierende Antikörper der IgG2-Subklasse oder nicht komplementaktivierende Antikörper der IgG1-Subklasse gebildet werden (Dedeoglu et al., 2004; Stavnezer et al., 2008).

Nach T-zellabhängiger Selektion entstehen aus den B-Zellen des Keimzentrums langlebige Plasmazellen, die sich im Knochenmark ansiedeln, sowie das B-Zellgedächtnis (Liu and Banachereau, 1997; Tarlinton, 2008) (**Abb. 1–2 (10)**). Einige B-Zellen (Zentrozyten) differenzieren nach dem T-Zellkontakt zurück zu Zentroblasten, um erneut in den Zyklus der B-Zellrezeptorreifung einzutreten und in einem zweiten Durchlauf die nötige T-Zellhilfe zur Differenzierung zu erhalten (Casamayor-Palleja et al., 1996; Victora et al., 2010) (**Abb. 1–2 (11)**).

1.2 T-zellvermittelte Induktion von Autoimmunerkrankungen

Eine gestörte Selektion von B-Zellen durch T-Helferzellen kann langlebige, autoreaktive B-Zellen hervorbringen, die wiederum Autoimmunerkrankungen nach sich ziehen können

(O'Shea et al., 2002; McHeyzer-Williams et al., 2009; Vinuesa et al., 2009). Daher ist der direkte, antigenspezifische Kontakt von T- und B-Zellen essenziell. Der spezifische Kontakt induziert nicht nur eine effiziente Aktivierung der B-Zelle, sondern hat auch eine Kontrollfunktion zur Verhinderung von Autoimmunkrankheiten. In Abwesenheit einer entsprechenden T-Zelle wird eine autoreaktive B-Zelle nicht aktiviert und wird auch so nicht dazu stimuliert, hochaffine autoreaktive Antikörper zu bilden. Autoreaktive T-Zellen können hingegen Autoimmunkrankheiten induzieren (Korganow et al., 1999).

Gravierende Auswirkungen haben Mutationen in den Signalkaskaden, die zur T-zellvermittelten B-Zellaktivierung führen. Eine Mutation (Substitution eines einzigen Basenpaars) im Sanroque-Mausstamm führt zu einer erhöhten Anzahl follikulärer T-Zellen und der damit verbundenen Akkumulation in Follikeln. Diese Mäuse bilden spontan Keimzentren aus und entwickeln einen zum systemischen Lupus erythematodes (SLE)-ähnlichen Phänotyp aus (Vinuesa et al., 2005a). Ein Transfer der follikulären T-Helferzellen aus Sanroque-Mäusen in Wildtyp-Tiere induziert spontan auftretende Keimzentren (Linterman et al., 2009).

Im Rattenmodell induzieren *in vitro* polyklonal (anti-TCR und anti-CD28) aktivierte T-Zellen nach Transfer eine Keimzentrumsreaktion. Diese Keimzentren sind zu 80 % endogenen Ursprungs, gebildet durch B-Zellen des Empfängers (Nachbar, 2000). Dies deutet auf eine Interaktion der injizierten T-Zellen mit den B-Zellen des Empfängertieres hin. Polyklonal aktivierte T-Zellen sind in der Lage unabhängig von einem Antigen eine heftige Keimzentrumsreaktion zu induzieren.

1.3 Fragestellung

Durch das Fehlen entsprechender Knockout-Tiere und kongener Rattenstämme konnte bisher jedoch der Mechanismus der Keimzentrumsinduktion nicht weiter untersucht werden. Um den Mechanismus genauer analysieren und seine Relevanz bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen klären zu können, ist das Ziel der vorliegenden Arbeit das Modell auf die Maus zu übertragen. In der Maus stehen Knockout-Tiere sowie kongene Mausstämme zur Verfügung. So werden T-Zellen mit einem verringerten T-Zellrezeptorrepertoire genutzt, um die Rolle des T-Zellrezeptors bei der Interaktion mit der B-Zelle zu untersuchen. CD154-Knockout-Tiere werden dazu genutzt, die Bedeutung der CD154-CD40-Signalkaskade bei der Bildung von Keimzentren zu untersuchen. Wegen der

Abwesenheit eines Antigens bei der Aktivierung der T-Zellen und anschließender Induktion von Keimzentren, wird zusätzlich der Bezug zu Autoimmunerkrankungen durch eine mögliche Produktion von Autoantikörpern untersucht. Außerdem werden kongene Mausstämme dazu genutzt, die transferierten Zellen im Empfängertier zu verfolgen.

Des Weiteren ist das Ziel dieser Arbeit bei der Epidermolysis bullosa acquisita die pathogenen Autoantikörper der IgG2-Subklasse durch nicht komplementbindende Autoantikörper der IgG1-Subklasse zu verdrängen. Um diese Hypothese zu prüfen, sollen in Versuchstieren durch eine Vorbehandlung (Impfung) zunächst Autoantikörper der IgG1-Subklasse induziert werden. Diese können sich anschließend an die Haut lagern. Da sie jedoch das Komplement nicht aktivieren, wird die Epidermolysis bullosa acquisita auch nicht induziert. Anschließend wird versucht, in diesen vorbehandelten Tieren die Krankheit auf ‚herkömmliche‘ Art und Weise zu induzieren (Sitaru et al., 2006). Die dann entstehenden pathogenen Autoantikörper sollen sich nicht an die Haut lagern und damit auch nicht die Epidermolysis bullosa acquisita induzieren können. Der Erfolg der Vorbehandlung wird über den gesamten Beobachtungszeitraum durch eine wöchentliche oberflächliche Untersuchung der Haut der Versuchstiere analysiert. Auswirkungen der Vorbehandlung auf die Autoantikörperproduktion werden durch Analyse der im Blut zirkulierenden gegen Kollagen-Typ-VII-spezifischen Autoantikörper verfolgt. Die Ablagerung der Autoantikörper an die Haut wird histologisch quantifiziert. Bei Erfolg könnte so eine äußerst spezifische Behandlung für antikörpervermittelte Autoimmunerkrankungen entwickelt werden.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Tiere

BALB/cAnNCrI	Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld
C57BL/6NCrI	Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld
C57BL/6Ly5.1	eigene Zucht (Prof. Dr. med Westermann, Universität zu Lübeck)
C.Cg-Tg(DO11.10)10Dlo/J (BALB/cJ Hintergrund)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. med. P. Steven (Zentrum für Augenheilkunde, Universität zu Köln)
B6;129S2-Cd40lgtm1Imx/J (C57BL/6 Hintergrund)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. D. Gray (Universität von Edinburgh, Großbritannien)
SJL/J	Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld

2.1.2 Antikörper

Purified Anti-Mouse CD45R/B220 (RA3-6B2)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Biotin conjugated polyclonal Rabbit Anti-Rat Immunglobulins	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
ExtraAvidin®-Alkaline Phosphatase	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
ExtraAvidin®-Peroxidase	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Rat Anti-Mouse Ki-67 Antigen (Clone TEC-3)	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Biotin conjugated Mouse Anti-Mouse CD45.1 (A20)	BioLegend, London, Großbritannien
Goat Anti-Hamster Immunglobulins (AP) (ab5746)	Abcam, Cambridge, Großbritannien

Hamster Anti-Mouse CD3ε chain (145-2C11)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Mouse Anti-Mouse CD28 (E18)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Hünig (Universität Würzburg)
Goat Anti-Mouse IgG1 (Alexa Fluor® 555)	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Rat Anti-Mouse IgG2b (FITC conjugated)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Goat Anti-Mouse IgG2c (FITC conjugated)	Bethyl, Montgomery, TX, USA
Goat Anti-Mouse Anti-Complement C3 (FITC conjugated)	MP Biomedicals, Solon OH, USA
Rabbit Anti-Mouse IgG (FITC conjugated)	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Sheep Anti-Mouse IgG (FITC conjugated)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Hamster Anti-Mouse TCRβ (FITC) (H57-597)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Hamster Anti-Mouse TCRβ (PE) (H57-597)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Rat Anti-Mouse CD19 (Alexa Fluor® 647) (1D3)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Rat Anti-Mouse CD4 (PE) (RM4-5)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Rat Anti-Mouse CD8α (Alexa Fluor® 647) (5H10)	Caltag Laboratories, Buckingham, Großbritannien
Biotin conjugated Hamster Anti-Mouse CD69 (H1.2F3)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Rat Anti-Mouse CD25 (PE-Cy TM 7) (PC61)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

2.1.3 Medien und Puffer

DNase-Puffer	200 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl ₂ , in A. bidest, pH 8,3
ELISA-Blockpuffer	50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% BSA, in A. bidest, pH 8,0
ELISA-Probenpuffer	50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% BSA, 0,05% Tween®20, in A. bidest, pH 8,0
ELISA-Waschpuffer	50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05% Tween®20, in A. bidest, pH 8,0
Ethanolamin-Puffer	1 M Ethanolamin, in A. bidest, pH 8
IgG-Elutionspuffer	0,1 M Glycin-HCl, pH 2,8

IgG-Neutralisationspuffer	1 M Tris base, in A. bidest, pH 9,0
IgG-Säulenreinigungslösung	20 mM Tris, 0,5 M NaCl pH 7.5
IgG-Waschpuffer	0,85 M NaCl, 0.1 % Triton X 100
MACS- / FACS-Puffer	PBS, 2 mM EDTA, 0,5 % BSA
MOPS-Puffer	0,1 M MOPS, 0,08 M CaCl ₂ , pH 7.5 (NaOH)
Mastermix (reverse Transkription)	4 µl 5x First Strand Buffer, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 250 ng Random- Primer in 1 µl DEPC-H ₂ O, 0,5 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl)
Narkoselösung	10 mg/ml Ketamin, 1,5 mg/ml Xylazin in A. bidest
PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Phosphat gepufferte Saline (10x Stock PBS)	2,5 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 140 mM, NaCl, 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ , in A. bidest, pH 7,25
Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI 1640), without L- Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
RPMI 1640 Wachstumsmedium	RPMI 1640; 10 % hitzeinaktiviertes FBS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 50 µM 2-Mercaptoethanol
SDS-PAGE 1x Laufpuffer	25 mM Tris ,192 mM Glycin, 0,1 % SDS
SDS-PAGE 2x Auftragspuffer	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 20 % Glycerin, 4 % SDS, 10 % 2-Mercaptoethanol, 0,05 % Bromphenolblau
SDS-PAGE Coomassieblau-Färbelösung	0,2 % Coomassie Brilliant Blue R, 10 % Essigsäure, 40 % Methanol
SDS-PAGE Entfärbelösung	10 % Essigsäure, 40 % Methanol
TBS-Tween	0,05 M TRIS, 0,05% Tween® 20, 0,8% NaCl in H ₂ O bidest, pH 7,6

2.1.4 Chemikalien und andere Reagenzien

Aceton, 99,8%, p.a.	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 Lösung	Amresco Inc., Solon, OH, USA
Affi-Gel 10	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Aluminiumhydroxid Gel	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Biotin conjugated PNA	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
DEPC-H ₂ O	0,1% DEPC in H ₂ O bidest
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dithiothreitol (DTT) 0,1 M	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
dNTP-Mix (10 mM)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
EDTA	Serva GmbH, Heidelberg
Einbettmedium, Tissue-Tek [®]	Leica Instruments GmbH, Nussloch
Eindeckmittel, Aquatex [®]	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol, 70%, 100%	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
FACS-Clean	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
FACS-Flow	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
FACS-Rinse	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Fast Blue BB Salt, Fast Red TR	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
First Strand Buffer, 5x	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fötales bovines Serum (FBS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Formaldehydlösung, 37%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Biomol GmbH, Hamburg
Ketanest [®] S (25 mg/ml)	Pfizer Pharma GmbH, Berlin
L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
2-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol, 99,9%, p.a.	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
MOPS	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mowiol [®] 4-88	Polysciences Inc., Warrington, PA, USA
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ovalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

PageRuler Prestained Protein Ladder 10 bis 170 kDa	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
PFA 4%	4% PFA (w/v) in PBS
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml/10 mg/ml)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Propidiumiodid	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
qPCR [®] Mastermix Plus	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln
Random-Primer (hexamers_rand)	MWG Biotech AG, Ebersberg
Reverse Transkriptase (BD PowerScript [™])	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Rompun [®] (20 mg/ml Xylazin)	Bayer HealthCare, Leverkusen
Salzsäure, 37 %	Merck KGaA, Darmstadt
Schwefelsäure, 98%	Merck KGaA, Darmstadt
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Streptavidin (APC)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
TiterMax [®] Classic	HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg
Toluidinblau	Waldeck GmbH & Co., Münster
Toluidinblau-Lösung (0,1%)	0,1% (w/v) Toluidinblau, 1% (v/v) Methanol, 15% (v/v) Ethanol in DEPC-H ₂ O
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Serva GmbH, Heidelberg
Tween [®] 20	Serva GmbH, Heidelberg
TMB Single Solution	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

10 cm Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
96 Well ELISA Platten	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
96 Well Multiply [®] -PCR-Platten, Polypropylen	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Amicon [®] Ultra Centrifugal Filters 30 NMWL	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Bepanthen [®] Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital, Leverkusen
Cell Strainer (70 µm Nylonsieb)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Centricon [®] 10.000 NMWL	Merck Millipore, Billerica, MA, USA

Combitips (unsteril)	Eppendorf AG, Hamburg
Cryogefäße	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Einmal-Küvette	Brand GmbH, Wertheim
FACS-Röhrchen (5 ml, steril)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Falcon--Gefäße, 15 und 50 ml	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Filterpapier	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel
Folienobjektträger, PALM® Polyethylenphthalat, 1 mm MembraneSlides	P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried
Glasobjektträger Superfrost Iso-Norm 8037	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co KG, Braunschweig
HiTrap™ Protein G HP Säulen, 1 ml	GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
Injektionskanüle Gr.18, 100 Sterican	B. Braun Melsung AG, Melsung
Klebefolien, optisch klar	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
MaxiSorb Mikrotiterplatten (96-well, Flachboden)	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
MS, LS, Columns (MACS)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Omnican® 40 Spritze 1 ml	B. Braun Melsung AG, Melsung
Omnifix-Feindosierungsspritze 1 ml	B. Braun Melsung AG, Melsung
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Polypropylen Säulen (5 ml)	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße Safe Seal 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml Polypropylen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Safe Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten (1, 2, 5, 10, 25 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Spritzenfilter PET 0,2 µm	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Steritop-GP, vakuumbetriebener Flaschenaufsatzfilter	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
U-40 Insulin Feindosierungsspritzen	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

2.1.6 Operationsmaterialien

Skalpelloklinge No. 25	Dimeda Instrumente, Tuttlingen
Einwegspritzen, 1 ml, steril (BD Plastipak™)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

Injektionskanülen, 0,45 x 13 mm (BD Microlance™ 3)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Instrumente aus hochlegiertem Edelstahl	Präparierschere, fein; Pinzette, anatomisch; Pinzette, chirurgisch; Uhrmacherpinzette

2.1.7 Kits

Analyse-Kit für Screen auf das Autoantikörperprofil	Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Analyse-Kit ANA-Titration (Zellkernautoantikörper)	Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Analyse-Kit dsDNA-Titration (doppelsträngige DNA)	Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
B Cell Isolation Kit II, Mouse	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit II, Mouse	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CD8 ⁺ T Cell Isolation Kit II, Mouse	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena AG, Jena
Mouse IgG1 ELISA Quantitation Set	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA
Mouse IgG2a ELISA Quantitation Set	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA
Mouse IgG2b ELISA Quantitation Set	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA

2.1.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden über die kommerziellen Hersteller MWG Biotech AG (Ebersberg) oder biomers.net GmbH (Ulm) bezogen. Die Sonden sind am 5'-Ende an das Fluorophor FAM (Emission: 520 nm) und am 3'-Ende an der Quencher TAMRA gekoppelt.

Tab. 2–1: In der Quantitativen Real-Time RT-PCR eingesetzten Oligonukleotide

Oligoname	Sequenz 5' > 3'	Produkt (bp)	Accession Nummer
MLN51 for	ccaagccagccttcattcttg	134	NM_138660.2
MLN51 rev	taacgcttagctcgaccactctg		
MLN51 Sonde	cacgggaacttcgaggtgtgcctaac		
IFN γ for	gcaaggcgaaaaaggatgc	98	NM_008337.2

MATERIALIEN UND METHODEN

IFNY rev	gaccactcggatgagctcattg		
IFNY Sonde	tgccaagtttgaggtaacaaccacag		
IL4 for	gagactctttcgggcttttcg	96	NM_021283.1
IL4 rev	aggctttccaggaagtctttcag		
IL4 Sonde	cctggattcatcgataagctgcacatg		

bp: Basenpaare; for: Vorwärtsprimer, rev: Rückwärtsprimer

2.1.9 Geräte

ACCU BLOCK, Digital Dry Bath	Labnet International Inc., Windsor, Berkshire, Großbritannien
BioPhotometer®	Eppendorf AG, Hamburg
Digitaler Blockthermostat	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
ELISA-Washer ELX405RS	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Eppendorf Research® Mehrkanalpipette (30 - 300 µl)	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
FACS Calibur® Durchflusszytometer	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
GelDryer Model 583	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heiz-Block	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
Homogenisator Sonopuls HD 2070	Bandelin electronic · GmbH & Co. KG, Berlin
Laser-Scanning Konfokalmikroskop LSM 510 Meta	Carl Zeiss Mikrolmaging GmbH, Göttingen
Magnetrührer IKA-Combimag RET	Janke & Kunkel GmbH&Co.KG, Staufen
Mikrodissektion, PALM® MicroBeam	P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss Mikrolmaging GmbH, Göttingen
µQuant™ Microplate Spektralphotometer	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Neubauer improved (Tiefe 0,02 mm)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH&Co KG, Sondheim
Persistaltic Pump P-1	GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
pH-Meter Beckman 3500 digital	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Pipetten Eppendorf Research	Gilson International B.V., Limburg-Offheim
Pipettierhilfe pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH&Co.KG, Eberstadt

QuadroMACS™ Starting Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Real-Time Sequence Detection System ABI PRISM® 7900	Applied Biosystems, Darmstadt
Schüttler, Titramax 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Serienschnittmikrotom, HYRAX C 50, Kryostat	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
Test Tube Shaker VWR1719	VWR International GmbH, Darmstadt
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR International GmbH, Darmstadt
UV-Licht G 30 Watt Sylvana	Bauhaus, Hamburg
Vakuumkonzentrationszentrifuge, Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg
Vortexer	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Waage, Kern 440-51N, Messgenauigkeit 1g	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Waage, Ohaus® Adventur- erTMAR0640, Messgenauigkeit 0,1 mg	Ohaus GmbH, Gießen
Wasserbad Typ3048	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Digifuge GL 2200	Heraeus Instruments GmbH, Hannover
Zentrifuge Megafuge 1.0 R /2.0 R Heraeus	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Zentrifuge, MiniSpin®Plus	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.10 Software

Adobe® Acrobat® CS 5	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Adobe® Illustrator CS 5	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Adobe® Photoshop® CS 5	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Axiovert 4.2 Software (Mikroskop)	Carl Zeiss Mikrolmaging GmbH, Göttingen
AxioVision 4.8	Carl Zeiss Mikrolmaging GmbH, Göttingen
CellQuest Pro® v4.0.2	CellQuest. Software, BD, Heidelberg
Fovea Pro 4.0	Reindeer Graphics Inc., Asheville, NC, USA
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
KCjunior™ Data Analysis Software 1.41.8	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
LSM 510 Meta 3.2	Carl Zeiss Mikrolmaging GmbH, Göttingen

LSM Image Browser Release 4.2	Carl Zeiss Mikrolmaging GmbH, Göttingen
Microsoft® Excel, Version 2011	Microsoft Cooperation, Mountain View, CA, USA
Microsoft® Word, Version 2011	Microsoft Cooperation, Mountain View, CA, USA
PALM® RoboSoftware	P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried
SDS 2.2.1 RQ Software	RQ Software Applied Biosystems, Darmstadt
Sigma Plot 11	Systat Software GmbH, Erkrath

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Gewinnung und *in vitro* Stimulation von Lymphozyten

Naiven Spendertieren wurden drei Tage vor Versuchsbeginn inguinale, mesenteriale und popliteale Lymphknoten entnommen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Lymphknoten in eisgekühltem RPMI 1640 Wachstumsmedium gelagert. Durch ein 70 µm Nylonsieb wurden die Lymphknoten schonend homogenisiert. Zum Entfernen des Überstands wurden die Zellen zentrifugiert. Vereinzelt waren störende Fettrückstände in der Zellsuspension. Um diese zu entfernen, passierten die Zellen erneut ein Nylonsieb und wurden erneut zentrifugiert. Für eine T-zellstimulierende Kultur, wurden am Vortag 10 cm Petrischalen mit 1 mg/ml anti-CD3 und 3 mg/ml anti-CD28 beschichtet und über Nacht (üN) bei 4°C inkubiert. Vor dem Aussäen der Zellen wurden die Petrischalen dreifach mit PBS gespült. Je Petrischale wurden 10-15 x 10⁶ Zellen in die T-zellstimulierende Kultur genommen. Am Tag null konnten die schwach adhärenen Zellen durch vorsichtiges Spülen in Lösung genommen werden. Vor dem Zelltransfer wurden die Zellen dreifach mit ausreichend PBS gespült. Nach Kultivierung hatte sich die Anzahl der ausgesäten Zellen um 1,5-2 vervielfacht.

2.2.1.2 Hitze- und Ultraschallbehandlung zur Tötung von Lymphozyten

Ruhende, frisch isolierte sowie *in vitro* stimulierte Lymphozyten wurden zur Tötung entweder einer Hitze- oder Ultraschallbehandlung unterzogen. Für die Hitzebehandlung wurden die Zellen im Heizblock inkubiert (45 min bei 90°C). Die Ultraschallbehandlung erfolgte mit dem Homogenisator Sonopuls (Bandelin electronic · GmbH & Co. KG, Berlin). Die Zellsuspension wurde auf Eis gekühlt und dem Ultraschallimpuls ausgesetzt (3x15 s) (Matsuzawa et al., 1997).

2.2.2 Tierversuche

2.2.2.1 Tierversuchsantrag

Alle Tiere wurden in den Räumen der gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck gehalten. Folgende Tierversuchsanträge wurden vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume von Schleswig-Holstein für dieses Projekt genehmigt.

Tierversuchsanträge:

„Identifikation des CD4⁺ T-Zellgedächtnisses und der Einfluss von Schlafregulierenden Zytokinen auf die CD4⁺ T-Zellgedächtnisbildung“ (V 312-72241.122-1 / 55-5/09)

Gültig vom 07.05.2010 bis 31.05.2013

Antragsteller: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

Stellvertreter: Prof. Dr. med. Peter König

„Untersuchungen zur Kinetik der Ausbildung von Autoimmunerkrankungen am Beispiel der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA)“ (V 312-72241.122-1 / 19-2/08)

Gültig vom 15.05.2008 bis 31.05.2010, verlängert bis 31.05.2011

Antragsteller: Dr. Katja Bieber

Stellvertreter: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

Tierversuchsanzeige:

„Identifikation von relevanten Zellen und Faktoren bei der Epidermolysis bullosa acquisita“ (V 312-72241.122-1 / 92-7/09)

Gültig vom 15.07.2010

Antragsteller: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

Stellvertreter: Prof. Dr. med. Peter König

2.2.2.2 Tiere und Haltungsbedingungen

Für alle Versuche wurden ausschließlich weibliche Labormäuse verwendet. BALB/c, C57BL/6 sowie SJL/J wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen. DO11.10, Ly5.1 und CD154-Knockout Tiere wurden von kooperierenden Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt und in eigener Zucht in Lübeck gehalten. Lediglich bei den Tieren der eigenen Zucht wurden

zum Teil männliche Tiere als Organspender verwendet. Die Tiere wurden in der spezifischen, pathogenfreien Barrierehaltung (SPF) der zentralen Tierhaltung der Universität zu Lübeck eingestallt. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in Gruppen von vier bis sechs Tieren je Standardkäfig (425 x 266 x 155 mm) aus transparentem Polycarbonat mit Abdeckgitter aus Edelstahl (E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland). Das Einstreu aus Holzspänen (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) wurde wöchentlich gewechselt. Wasser und Standard-Pelletfutter (Altromin 1430, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. In den klimatisierten Räumen wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 Stunden simuliert (Hellphase 05:00 - 17:00 Uhr). Vor Versuchsbeginn konnten sich die Tiere eine Woche akklimatisieren. Die Tiere wurden im Alter von 8 bis 10 Wochen für die Versuchsvorhaben verwendet.

2.2.2.3 Intravenöser Lymphozytentransfer

Die Versuchstiere wurden etwa drei Minuten unter Infrarotlicht gesetzt und anschließend in einer dafür speziell angefertigten Plexiglasröhre immobilisiert. Die Applikation von PBS, ruhenden Lymphozyten, *in vitro* stimulierten Lymphozyten sowie separierten Zellpopulationen erfolgte intravenös in die Schwanzvene. Die gewünschte Zellkonzentration wurde in einem Volumen von 200 µl appliziert. Es wurden 10^7 ruhende sowie stimulierte Lymphozyten intravenös verabreicht. Separierte Zellen wurden ihrem natürlichen, prozentualen Vorkommen in der Lymphozytensuspension (bestimmt mittels Durchflusszytometrie) appliziert.

2.2.2.4 Vorbehandlung und Immunisierung zur Induktion der Epidermolysis bullosa acquisita

Für die Vorbehandlung wurde das rekombinante murine Kollagen-Typ-VII C-Fragment (mCol7C-GST) (49,5 kDa), GST (26 kDa) oder Ovalbumin (42,8 kDa) verwendet. Die Vorbehandlung erfolgte mit 40 µg Kollagen-Typ-VII sowie mit äquimolaren Mengen der Proteine GST und Ovalbumin. Die Krankheit wurde mit 60 µg Kollagen-Typ-VII in einem Volumen von 50 µl induziert. Das Kollagen-Typ-VII und GST wurden von der Klinik für Dermatologie und Venerologie, Lübeck, gewonnen und zur Verfügung gestellt (Sitaru et al., 2005). Die Reinheit und die Konzentration der verwendeten Proteine wurden mit einem SDS-Gel überprüft. Die Lagerung bis zur Verwendung erfolgte bei -80°C. Einzig Ovalbumin

wurde vor Versuchsbeginn frisch angesetzt. Die Konzentration wurde für die verwendeten Proteine eingestellt und durch die Zugabe der Adjuvantien Titermax (Bennett et al., 1992) (Stills, 2005) und/oder Aluminiumhydroxid wurden Emulsionen für die Immunisierung hergestellt (**Tab. 2–2**). Bis zur Bildung der Emulsion wurden die Lösungen 30 bis 45 Minuten bei 6°C kräftig geschüttelt (Fixierung auf laufendem Vortexer).

Tab. 2–2: Schema zur Vorbehandlung und Immunisierung der Versuchstiere

Vorbehandlung:

	Protein		Adjuvans	
	Bezeichnung:	Konzentration:	Titermax	Aluminiumhydroxid
1.	---	---		
2.	mCol7C-GST	0,8 mg/ml	43 %	43 %
3.	GST	0,4 mg/ml	43 %	43 %
4.	Ovalbumin in A+TM	0,7 mg/ml	43 %	43 %
5.	Ovalbumin in A	0,7 mg/ml	---	43 %
6.	A+TM	---	43 %	43 %

Krankheitsinduktion:

	mCol7C-GST	1,2 mg/ml	50 %	---
--	------------	-----------	------	-----

mCol7C: murines Kollagen-Typ-VII, A: Aluminiumhydroxid, TM: Titermax, GST: Glutathion-S-Transferase

Versuchstiere wurden durch intraperitoneale Gabe von 150 µl Narkoselösung für etwa 20 bis 30 Minuten narkotisiert. Die Versuchstiere wurden subkutan mit 50 µl Emulsion vorbehandelt. Die Vorbehandlung erfolgte nach folgendem Muster:

- Woche -9: 50 µl in die linke Hinterpfote
- Woche -6: 50 µl in die rechte Hinterpfoten
- Woche -3: 50 µl in die Schwanzbasis

Die Krankheit wurde durch eine subkutane Injektion von jeweils 25 µl der Emulsionslösung in beide Hinterpfoten induziert (Sitaru et al., 2006).

2.2.2.5 Evaluation der Erkrankung

Der Krankheitsverlauf wurde durch wöchentliche Untersuchung der Versuchstiere über den gesamten Versuchszeitraum verfolgt. Dabei wurde die Haut der Tiere nach

charakteristischen, oberflächlichen Krankheitssymptomen der Epidermolysis bullosa acquisita untersucht. Diese zeichneten sich durch Erytheme, Blasen, Erosionen, Krusten und Alopezie, vor allem im Bereich der Ohren und des Kopfes, aus. Betroffen waren zudem die Hinterbeine, der Nackenbereich sowie Teile des Torsos. Das Ausmaß der betroffenen Areale der Körperpartien wurde geschätzt und zu einem Totalbefall der gesamten Körperoberfläche kumuliert. Zusätzlich wurde den Tieren alle zwei Wochen Blut entnommen, um den Verlauf der zirkulierenden Autoantikörper bestimmen zu können.

2.2.2.6 Organentnahme

Drei, sechs, zehn bzw. vierzehn Tage nach Lymphozytentransfer sowie 13 Wochen nach Krankheitsinduktion wurden die Versuchstiere mit Kohlenstoffdioxid getötet. Blut wurde durch einen Schnitt ins Herz entnommen. Die Lagerung der Organe erfolgte in Kryogefäßen bei -80°C. Der Eingriff erfolgte unter sauberen jedoch nicht sterilen Bedingungen in Räumlichkeiten der zentralen Tierhaltung. Für die Organentnahme wurden die Operationsinstrumente zuvor mit 0,1 % SDS und 70 % Ethanol gereinigt und desinfiziert.

2.2.3 Immunbiologische Methoden

2.2.3.1 Zellseparation (*Magnetic cell sorting: MACS*)

Für den Transfer einzelner Zellpopulationen wurden diese mittels der negativen magnetischen Zellsortier-Kits (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) nach Angaben des Herstellers isoliert. In diesen Kits wird ein Biotin-Antikörpercocktail benutzt, der alle Zellen außer der gewünschten Zellpopulation markiert.

10^8 Lymphozyten wurden in 400 µl MACS-Puffer aufgenommen und mit 100 µl Antikörpercocktail inkubiert (15 min, 4°C). Anschließend wurden 300 µl Anti-Biotin-Beads hinzugesetzt und erneut inkubiert (15 min, 4°C). Die Zellen wurden gewaschen (10 min, 300 g, 4°C) und in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen. Eine MACS LS-Säule wurde in einem MACS-Magneten platziert und mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde auf die Säule gegeben und der Durchfluss in einem Falcon aufgefangen. Die Säule wurde dreifach mit je 4 ml MACS-Puffer gespült. Der Durchfluss enthielt die gewünschte Zellpopulation, während auf der Säule die unerwünschten Zellen zurück gehalten wurden. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt. Durch erneutes Spülen

konnten die markierten Zellen in einem neuen Falcon aufgefangen werden. Die Reinheit der separierten Zellen wurde mit der Durchflusszytometrie analysiert.

2.2.3.2 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie wurde die Qualität der Zellseparationen untersucht. Vor und nach der Kultivierung wurden die Aktivierung sowie die Vitalität der Zellen überprüft. Außerdem wurde das Verhältnis von T- zu B-Zellen sowie der Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bestimmt. Je Färbeansatz wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. In einem Vorversuch wurden zunächst die zu verwendenden Konzentrationen der verschiedenen Antikörper getestet (**Tab. 2–3**). Die Zellen wurden mit den verschiedenen Antikörpern inkubiert (30 min, im Dunkeln, 4°C). Die Zellen wurden gewaschen (7 min, 1000 g, 4°C) und in 0,5 ml FACS-Puffer aufgenommen.

Zur Analyse im Durchflusszytometer wurde um die Lymphozytenpopulation ein digitales Gate gelegt und die Färbung der im Gate liegenden Zellen untersucht (CellQuest Pro®).

Tab. 2–3: Verdünnungen der in der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper

Antikörper	Tag -3 vor Stimulation	Tag 0 nach Stimulation
CD69 (Biotin)	1:500	1:500
Streptavidin (APC)	1:100	1:100
CD25 (PE-Cy TM 7)	1:2000	1:2000
Propidiumiodid	1:100	1:100
TCRβ (PE)	1:500	1:100
CD19 (Alexa Fluor® 647)	1:1000	1:500
TCRβ (FITC)	1:2000	1:500
CD4 (PE)	1:2000	1:500
CD8α (Alexa Fluor® 647)	1:2000	1:500

2.2.3.3 *Enzym-linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) von Kollagen-Typ-VII-spezifischen Autoantikörpern

Die Kollagen-Typ-VII-spezifischen Autoantikörper wurden mit den Kits zur Quantifizierung der Maus-IgG-Subklassen (IgG1, IgG2b und IgG2c) von Bethyl nach den Angaben des Herstellers untersucht. Die Analyse erfolgte in den

96-Well-Flachbodenmikrotiterplatten. Am Vortag der Analyse wurden die Platten mit 50 µl einer 2,5 µg/ml mCol7C-His in PBS Verdünnung beschichtet. Im Gegensatz zur Immunisierung (mCol7C-GST) wurde für die Beschichtung das gleiche Kollagenfragment, jedoch mit dem His-Tag anstelle des GST-Tag, verwendet. So wurde eine ungewollte Detektion von GST-Antikörpern vermieden. Für die Eichgerade wurde der Coating-Antikörper des Kits 1:100 in PBS verdünnt und die ersten beiden Reihen (16 Wells) wurden mit 50 µl dieser Verdünnung beschichtet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Platten wurden dreimal gewaschen (100 µl ELISA-Waschpuffer) und 1 h bei Raumtemperatur (RT) auf einem Rütteltisch bei 800 UpM geblockt (100 µl ELISA-Blockpuffer). Die Platten wurden erneut dreimal gewaschen (100 µl ELISA-Waschpuffer). Anschließend wurden die Proben im ELISA-Probenpuffer verdünnt ($1:5 \times 10^3$, $1:2,5 \times 10^4$, $1:1,25 \times 10^5$, $1:6,25 \times 10^5$) und in Doppelbestimmung auf die Platte aufgetragen. Als Standard werde das im Kit enthaltene Referenzserum mit bekannter Konzentration der Antikörpersubklassen (IgG1, IgG2b und IgG2c) in einer Verdünnungsreihe in Doppelbestimmung aufgetragen. Die Platten wurden für 1 h mit den Proben inkubiert (RT, Rütteltisch) und anschließend dreimal gewaschen (100 µl ELISA-Waschpuffer). Die HRP-konjugierten Detektionsantikörper wurden mit ELISA-Probenpuffer verdünnt (IgG1-HRP: $1:10^5$, IgG2b-HRP: $1:10^5$ und IgG2c-HRP: $1:3 \times 10^4$) und mit 50 µl je Well aufgetragen. Nach 1 h Inkubation (RT, Rütteltisch) wurden die Platten ein letztes Mal gewaschen (100 µl ELISA-Waschpuffer). Die Entwicklung erfolgte mit 50 µl TMB-Lösung. Die Proben wurden 4:45 Minuten auf dem Rütteltisch inkubiert, bevor die Farbreaktion mit 50 µl 2 M Schwefelsäure abgestoppt wurde. Die Farbreaktion wurde mit dem ELISA-Platten-Spektrometer bei 450 nm bestimmt (Hammers et al., 2011).

Den Extinktionswerten der Standardreihe konnten die bekannten Konzentrationen zugeordnet werden. Anhand der sigmoidal verlaufenden Standardkurve konnte durch Regression (Chapman, 3 Parameter; Funktion: $y = a(1 - e^{-bx})^c$) eine relative Konzentration zugeordnet werden. Dies war relativ und nicht absolut, da absolut nur bei exakter Gleichheit für Standardkurve und Proben gegeben wäre. Da jedoch in dem ELISA die Platten für die Standardkurve und die Proben verschieden beschichtet wurden, konnte nur ein relativer Wert für die Autoantikörper der Proben angegeben werden.

2.2.4 Immunhistologische Methoden

2.2.4.1 Kryosektion

Veränderungen der Morphologie, Zelllokalisierung sowie Folgen der Krankheitsinduktion wurden durch histologische Färbung von Gefrierschnitten untersucht. Die Organe (Milz, Lymphknoten und Haut) wurden bei -20°C auf einem Objektisch in Einbettmedium fixiert und mit dem Serienschneidmikrotom Hyrax C50 (Zeiss, Jena) in 12 µm dünne Organschnitte auf Glasobjektträger (Superfrost, für Immunhistologie) oder Folienobjektträger (für Lasermikrodissektion) übertragen und getrocknet (2 h bei RT). Die Schnitte auf dem Folienobjektträger wurden mit Toluidinblau gefärbt und bis zur weiteren Verarbeitung in der Lasermikrodissektion bei -80°C gelagert. Alle anderen Objektträger wurden immunhistologisch oder fluoreszenzgefärbt.

2.2.4.2 Färbungen

Für die immunhistologischen Färbungen wurden die in **2.1.2** aufgeführten Antikörper verwendet. Die Antikörper wurden in der Regel in TBS-Tween angesetzt, Ausnahmen sind gekennzeichnet. FastRed und Fast Blue wurden in APAAP-Substrat angesetzt. Alle Spülschritte, sofern nicht anders gekennzeichnet, wurden mit TBS-Tween durchgeführt. Die Färbungen mit Fast Red und Fast Blue erfolgten auf der Rüttelplatte. Präparate wurden mit den Antikörpern stets bei Raumtemperatur in speziellen, dunklen Feuchtkammern inkubiert.

Toluidinblau

Für die Lasermikrodissektion wurden die Präparate auf den Folienobjektträgern mit Toluidinblau gefärbt. Dazu wurden die Präparate in 75% Ethanol fixiert (2 min), anschließend in DEPC-Wasser gespült (2 min) und mit 0,1% Toluidinblau gefärbt (10 min). Die Objektträger wurden zweimal in DEPC-Wasser gespült (je 15 s) und durch zweimaliges Spülen mit 100% Ethanol entwässert (je 15 s). Die Präparate wurden kurz getrocknet und bei -80°C gelagert.

Ki-67/B220

Keimzentrumbildung wurde durch eine Färbung der proliferierenden B-Zellen untersucht. Ki-67 ist ein Protein, das während aller Phasen des aktiven Zellzyklus exprimiert

wird. Die Präparate wurden mit Chloroform und Aceton fixiert (je 10 min), anschließend gespült (2 x 5 min) und mit Paraformaldehyd inkubiert (45 min). Nach erneutem Spülen (2 x 5 min) wurde mit dem Antikörper gegen Ki-67 (1:100 verdünnt in PBS 1 % BSA 0,1 % NaN₃) inkubiert (üN). Nach dem Spülen (2 x 5 min) wurden die Präparate mit biotinylierten, polyklonalem anti-Ratte Antikörper (pAK) (1:500 verdünnt in TBS-Tween mit 5 % Mausserum) inkubiert (30 min). Nach dem Spülen (2 x 5 min) folgte eine Inkubation mit 1:100 verdünnter ExtrAvidin®-Alkaliner Phosphatase (30 min). Nach dem Spülen (2 x 5 min) erfolgte die Farbreaktion mit Fast Red (25 min). Die Objektträger wurden gespült (2 x 5 min) und mit dem anti-CD45R/B220 Antikörper (1:100 verdünnt in PBS 1 % BSA 0,1 % NaN₃) inkubiert (1 h). Nach dem Spülen (2 x 5 min) wurde mit pAK inkubiert (1:500 verdünnt in TBS-Tween mit 5 % Mausserum) (30 min). Anschließend wurde gespült (2 x 5 min) und mit 1:100 verdünnter ExtrAvidin®-Alkaliner Phosphatase (30 min) inkubiert. Die Farbreaktion erfolgte mit Fast Blue (25 min).

CD3/PNA

Die im Keimzentrum liegenden T-Zellen wurden gefärbt. Die Präparate wurden in Methanol/Aceton 1:1 fixiert (10 min bei -20°C) und anschließend erfolgte die T-Zellfärbung mit Hamster Anti-Mouse CD3ε Antikörper (1:50 verdünnt in PBS 1 % BSA 0,1 % NaN₃) gefärbt (üN). Die Präparate wurden mit Goat anti-Hamster Antikörper (Alkaline Phosphatase) (1:50 verdünnt in TBS-Tween mit 5 % Mausserum) inkubiert (1 h). Die Farbreaktion erfolgte mit Fast Blue (25 min). Die Keimzentren wurden mit dem biotinylierten PNA-Antikörper (1:1000 verdünnt in TBS-Tween) angefärbt (1 h) (Rose et al., 1980). Nach der Inkubation mit 1:100 verdünnter ExtrAvidin® Peroxidase (30 min) wurden die Präparate mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) gefärbt (5 min). Zwischen den Inkubationen wurde gespült (2 x 5 min).

CD45.1/B220

Die transferierten Lymphozyten des C57BL/6Ly5.1-Mausstamms wurden mit dem Antikörper gegen CD45.1 gefärbt. Leukozyten der Wildtyp-Tiere exprimieren auf ihrer Plasmamembran hingegen CD45.2. Die Gefrierschnitte der Milzpräparate wurden in Methanol/Aceton 1:1 fixiert (10 min bei -20°C). Die transferierten Zellen wurden mit dem biotinylierten Mouse anti-Mouse Antikörper (1:50 verdünnt in TBS-Tween) gefärbt (1 h). Die Präparate wurden zunächst mit 1:100 verdünnter ExtrAvidin® Peroxidase (30 min) inkubiert

und anschließend mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) gefärbt (5 min). Die B-Zellen wurden mit dem anti-CD45R/B220 Antikörper (1:100 verdünnt in PBS 1 % BSA 0,1 % NaN₃) markiert (1 h). Nach Inkubation mit dem biotinylierten, polyklonalen anti-Ratte Antikörper (1:500 verdünnt in TBS-Tween mit 5 % Mausserum) (30 min) und mit 1:100 verdünnter ExtrAvidin®-Alkaliner Phosphatase (30 min) wurde die Farbreaktion mit Fast Blue durchgeführt (25 min). Zwischen allen Inkubationsschritten wurde gespült (2 x 5 min).

Direkte Immunfluoreszenzfärbung von IgG1, IgG2b, IgG2c und C3

Die Fluoreszenzfärbungen wurden nach der Methode der direkten Immunfluoreszenz (DIF) angefertigt. Dabei wurden die an der Haut gebundenen Antikörper direkt mit einem fluoreszenzgekoppelten, sekundären Antikörper gefärbt. Die Gefrierschnitte der Hautpräparate wurden in Methanol/Aceton 1:1 fixiert (10 min bei -20°C). Nach dem Spülen (2 x 5 min) folgte eine Inkubation mit dem entsprechenden fluorochromkonjugierten Antikörper (1 h bei RT). Die Antikörper wurden wie folgt verdünnt:

Goat Anti-Mouse IgG1 (Alexa Fluor® 555)	1:400
Rat Anti-Mouse IgG2b (FITC conjugated)	1:400
Goat Anti-Mouse IgG2c (FITC conjugated)	1:1000
Goat Anti-Mouse Anti-C3 (FITC conjugated)	1:200

Nach dem Spülen (2 x 5 min) wurden die Präparate in Mowiol® 4-88 eingedeckt.

Indirekte Immunfluoreszenzfärbung - Nachweis von Autoantikörpern

Für den Nachweis von Autoantikörpern im Serum nach dem Transfer aktivierter Lymphozyten wurde ein Autoantikörperprofil erstellt (FB 1599-0110-2; Euroimmun, Lübeck). Dazu wurde das Serum 1:10 in PBS-Tween verdünnt. Für den Nachweis von Autoantikörpern gegen Zellkernstrukturen (ANA) und zytoplasmatische Autoantikörper wurden als Substrat HEP2-Zellen sowie Primatenleber und Rattenniere verwendet (FB 0805-0110). Hier wurde das Serum 1:10, 1:32 sowie 1:100 verdünnt. Doppelstrang-DNA wurde mit tierpathogenen Hämoflagellaten der Art *Crithidia Liciliae* untersucht (FB 1572-0110). Das Serum wurde bei diesem Test 1:10 und 1:32 verdünnt und mit verschiedenen auf Mikrochips fixierten Substraten inkubiert (Stöcker et al., 1998). Mit diesen Testverfahren lassen sich diverse Autoantikörper nachweisen. Es kann unterschieden werden zwischen Autoantikörpern gegen Antigene aus:

Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Nebenniere, Ovar, Placenta, Testis, Hypophyse, Hypothalamus, Pankreas, Leber, Niere, Magen, Darm, Parotis, Ösophagus, Spermatozoen, Crithidien, Granulocyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Nerven, Kleinhirn, Großhirn, Rückenmark, HEp-2 Zellen (Autoantikörper gegen zytoplasmatische Antigene sowie Strukturen des Kerns), Skelettmuskel und Herzmuskel

Das verdünnte Serum wurde mit den verschiedenen mit Aceton fixierten Substraten inkubiert. Autoantikörper positiver Proben konnten ihr Antigen binden. Im zweiten Schritt wurden die gebundenen Autoantikörper mit einem FITC-markierten Sheep anti-Mouse IgG gefärbt (F6257; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim). Die Färbung wurde an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop quantitativ und/oder qualitativ ausgewertet.

2.2.5 Digitale Bildanalyse zur Auswertung der histologischen Präparate

2.2.5.1 Bestimmung der Keimzentrumsfläche und der T-Zellen innerhalb der Keimzentren

Am Lichtmikroskop (Axiovert 200) wurden repräsentative Bereiche der Milz fotografiert. Unter der Zuhilfenahme der ImageJ-Software wurden die einzelnen Keimzentrumsflächen sowie die Milzschnittfläche vermessen. So konnte der prozentuale Anteil der Keimzentren an der Ausschnittfläche berechnet werden. Auch die Anzahl der T-Zellen innerhalb des Keimzentrums wurde mit ImageJ bestimmt. Dazu wurden je Versuchstier fünf Keimzentren fotografiert, mit der Software ausgeschnitten und mit dem integrierten Zellzähler ausgezählt. Die T-Zellzahl wurde auf die Fläche des Keimzentrums normiert.

2.2.5.2 Bestimmung der Ablagerung von Autoantikörpern an die dermo-epidermale Junktionszone

Die Immunfluoreszenzfärbungen der Hautpräparate wurden mit dem Laser-Scanning Konfokalmikroskop untersucht. Dazu wurden je Versuchstier drei repräsentative Hautareale mit Ablagerung der Autoantikörper oder des Komplementfaktors C3 aufgenommen und mit Hilfe des FoveaPro 4.0 Plugins für Photoshop ausgewertet (Radant, 2008). Für die digitale Bildanalyse wurden die Fluoreszenzaufnahmen in Bilddateien mit RGB-Farbmodus (8-Bit) konvertiert. Anschließend folgte eine Kalibrierung von Pixelgröße auf Längeneinheit (μm).

Manuell musste anschließend grob der Umriss der Basalmembran (sofern dieser nicht automatisch erkannt wurde) eingezeichnet werden. Es folgte eine automatische Umwandlung in ein Graustufen-Bild. Mit dem Filter IP*Measure Global - Brightness wurde die Farbinformation quantifiziert und auf die Länge der dermo-epidermalen Junctionszone bezogen.

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 Lasermikrodissektion

Durch die Toluidinblaufärbung konnten die Organstrukturen identifiziert werden, so dass die T- und B- Zellzonen mit der PALM® RoboSoftware markiert und mit einem Laser herausgeschnitten werden konnten. Das ausgeschnittene Gewebe ($3,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ je Kompartiment) wurde in Verschlusskappen von Reaktionsgefäßen in inertem Mineralöl aufgefangen. Anschließend wurde das Gewebe in 350 μl Lysispuffer durch Vortexen (1 min) aufgeschlossen und denaturiert. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und bei -20°C gelagert.

2.2.6.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Für möglichst RNase-freien Bedingungen wurden die Arbeitsoberflächen mit 1 % SDS-Lösung gereinigt. Mit dem innuPREP RNA Kit wurde aus den Proben die Gesamt-RNA gemäß den Angaben des Herstellers gewonnen. Dazu wurden die in Lysispuffer aufgenommenen Proben für 1 min gevortext und kurz bei 10.000 g abzentrifugiert. Durch zehnmaliges Aufziehen mit einer feinen Einwegspritze wurde die genomische DNA geschert. Den Proben wurden 350 μl 70 % Ethanol zugesetzt. Das gesamte Volumen wurde auf die Spin Filter R Säule gegeben und 2 min bei 10.000 g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschrte mit 500 μl Washing Solution HS und 700 μl Washing Solution LS (je 1 min, 10.000 g). Das Filtrat wurde jeweils verworfen. Die Säule wurde durch erneute Zentrifugation getrocknet (2 min, 10.000 g). Die RNA wurde mit 60 μl RNase-freiem Wasser in ein neues Reaktionsgefäß eluiert (1 min, 6.000 g). Zur Steigerung der RNA-Konzentration wurde das Eluat erneut auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend verworfen. Die gelöste RNA wurde auf 8 μl in einer Vakuumzentrifuge eingedampft (20-25 min, 60°C). Bei Bedarf wurde das Probenvolumen auf 8 μl erhöht.

Die verbliebene genomische DNA wurde durch Zugabe von 1 µl 10x DNase-Puffer und 1 µl DNase-I-Enzym (1 U/µl) verdaut (15 min bei 20°C). Die Reaktion wurde mit 1,5 µl 15 mM EDTA-Stopplösung abgebrochen (10 min bei 70°C). Die Proben wurden auf Eis gelagert. Die RNA wurde durch Zugabe von 8,5 µl Reverse Transkriptase Mastermix in cDNA umgeschrieben (50 min bei 42°C). Die Reaktion wurde durch Inaktivierung der Reversen Transkriptase abgestoppt (15 min bei 70°C). Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.2.6.3 Quantitative Real-Time (RT) -PCR

Mit der Echtzeit-Polymerasekettenreaktion wurde die relative Genexpression quantifiziert. Dazu wurde das ABI Prism® 7900 Sequence Detection System verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide sind in 2.1.8 zusammengetragen. Für die Bestimmung der Genexpression wurden je PCR-Ansatz 0,625 µl cDNA-Probe, 2 µl Primer-Sonden-Mix, 10 µl 1x Mastermix (qPCR Core Kit für TaqMan) und 7,375 µl Aqua destillatum verwendet. Der folgende PCR-Zyklus wurde verwendet: zunächst Denaturierung (6 min bei 95°C), anschließend 50 Zyklen mit Denaturierung (30 s bei 95°C) und Primeranlagerung und Elongation (1 min bei 60°C). Die Auswertung in Form von Bestimmung der *ct*-Werte (*cycle of threshold*) erfolgte mittels der SDS 2.2.1 RQ Software. Der Schwellenwert wurde auf 0,2 gesetzt. Für jede Probe wurde die Kopienzahl des untersuchten Zytokins pro Kopie des Housekeeping Gens MLN51 mit der Formel

$$2^{(ct \text{ MLN51} - ct \text{ Zytokin})}$$

berechnet. Wenn der *ct* von MLN51 größer als 38 war, dann wurde diese Probe aus der Auswertung ausgeschlossen, da in diesem Bereich keine technisch zuverlässige Auswertung möglich war. Aufgrund von methodischen Schwankungen konnten *ct*-Werte der Doppelbestimmung von einander abweichen. Eine Differenz der *ct*-Werte der technischen Replikate von 1, was der doppelten cDNA-Menge entspricht, wurde daher als maximale Schwankung akzeptiert.

2.2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.2.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Proteine GST, mCol7C-GST und mCol7C-His, die von der Klinik für Dermatologie und Venerologie sowie im Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck, hergestellt wurden,

wurde die Reinheit und die Proteinkonzentration durch die denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft (**Abb. 2–1**) (Laemmli, 1970). Zunächst wurden die Proteinproben bei 95°C im SDS-haltigen Ladepuffer denaturiert und mit negativen Ladungen gesättigt. Dadurch konnte in der Gelelektrophorese die Eigenladung der Proteine vernachlässigt werden, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel primär vom Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins abhängig war. Die Elektrophorese erfolgte in einem diskontinuierlichen Gel, bestehend aus einem Trenn- und einem Sammelgel (**Tab. 2–4**). Das Gel wurde mit den Proben beladen. Das Molekulargewicht konnte durch den Protein-Größenstandard bestimmt werden (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Stromstärke von 45 mA.

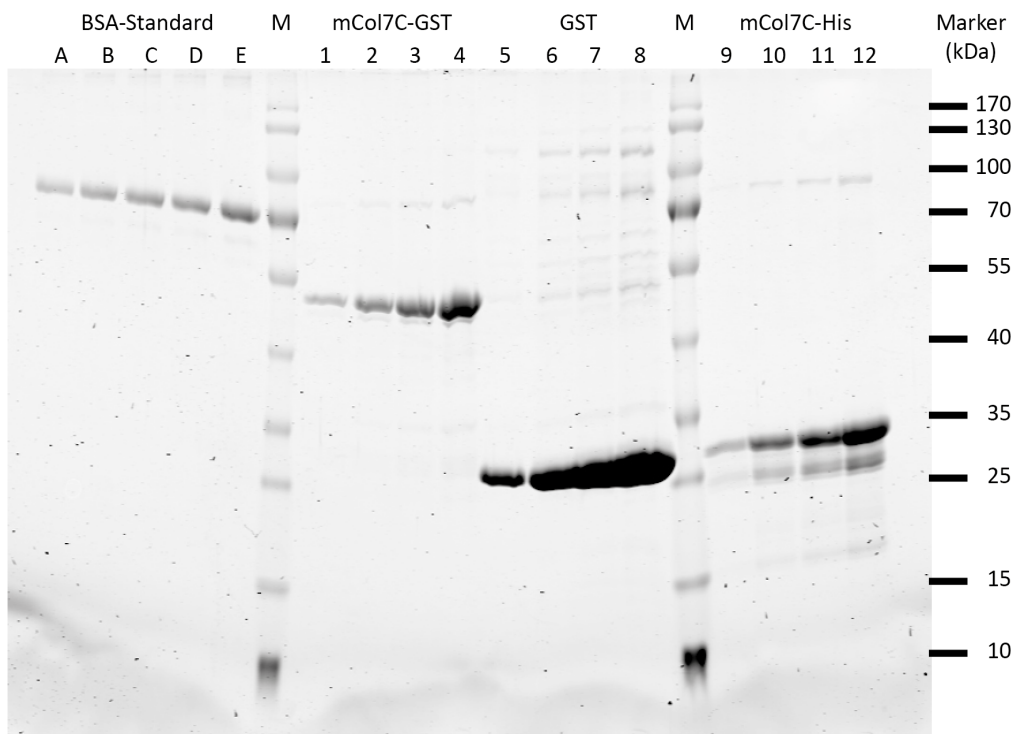


Abb. 2–1: SDS-PAGE der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine. Spuren A-E: BSA-Standard mit bekannter Konzentration (0,3 / 0,6 / 0,9 / 1,2 und 1,5 µg); Spuren 1-4: mCol7C-GST (49,5 kDa); Spuren 5-8: GST (26 kDa) und Spuren 9-12: mCol7C-His (23,5 kDa). Der eingesetzte Proteingrößenstandard (M, Marker) ist neben dem Gel schematisch eingezeichnet, um den Proteinbanden des Markers die entsprechenden Molekulargewichte zuzuordnen. Elektrophorese erfolgte in einem 12,5 %-igen Trenngel.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel verworfen. Das Trenngel wurde mit der Coomassie-Färbelösung auf einem Schütteltisch inkubiert (15 min bei RT) (Tal et al., 1985). Der nicht an Proteine gebundene Farbstoff wurde durch mehrmaliges Waschen

des Trenngels mit Entfärbelösung entfernt (4x 30 min). Das Gel wurde auf Filterpapier in einem Gelrockner (BioRad GelDryer Model 583) getrocknet.

Tab. 2–4: Trenn- und Sammelgel für die diskontinuierliche Gelelektrophorese

Trenngel (12,5 %):	Sammelgel (5 %):
12,5 % Acrylamid	5 % Acrylamid
0,4 % Bisacrylamid	0,17 % Bisacrylamid
375 mM Tris-HCl, pH 8,8	75 mM Tris-HCl, pH 6,8
0,1 % SDS	0,16 % SDS
0,05 % APS	0,08 % APS
0,25 % TEMED	0,4 % TEMED

Als Stocklösung wurde eine 29:1 Mischung (38,7 % Acrylamid / 1,3 % Bisacrylamid) verwendet.

2.2.7.2 Isolation von gesamten IgG-Antikörpern

Für die Isolation der gesamten IgG-Antikörper wurde die HiTrap™ Protein G Säule (1 ml) verwendet. Zunächst wurde die Säule an das Pumpsystem angeschlossen und mit einer Flussrate von 1 ml/min mit 10 bis 20 ml PBS gespült. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen in das System eingelassen werden. Über den Einführschlauch wurde das Plasma auf die Säule geladen. Nach einem erneuten Spülvorgang mit 10 ml PBS wurden die Gesamt-IgG-Antikörper mit 10 ml Eluationspuffer (0,1 M Glycin-HCl, pH 2,8) von der Säule gelöst. Das Eluat wurde in Reaktionsgefäßen, in denen 75 µl 1 M Tris-Base (pH 9,0) zur Neutralisierung vorgelegt wurden, in Fraktionen zu je 1 ml aufgefangen. Mittels eines Photometers wurde die Konzentration in den verschiedenen Fraktionen bestimmt. Die antikörperenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und der pH wurde mit 1 M Tris Base (pH 9,0) auf pH 7,1 eingestellt. Die Säule wurde mit dem Eluationspuffer gespült bis die gebundenen Antikörper vollständig von der Säule entfernt waren. Anschließend wurde die Säule mit 10 ml PBS und mit 10 ml 20 % Ethanol gespült. Die Säule wurde in 20 % Ethanol bei 4°C gelagert.

Der Puffer der IgG-Antikörperfraktion wurde gegen PBS durch Dialyse (2,5 l PBS für 3 h und 2,5 l PBS üN) oder durch eine Zentrifugation über einen Amicon-Filter (30.000 NMWL) gewechselt (4 ml PBS, 10 min bei 4000 UpM und 4°C). Auch die Antikörperlösung wurde bei 4°C gelagert.

2.2.7.3 Herstellung einer Kollagen-Typ-VII-spezifischen Säule

Für die Isolation der Kollagen-Typ-VII-spezifischen Autoantikörper wurde eine Säule mit mCol7C-His beladen. 5 mg mCol7C-His wurden gegen 0,1 M MOPS-Puffer dialysiert (2,5 l MOPS für 3 h und 2,5 l MOPS üN). Das Gelmaterial (Affi-Gel 10) wurde, bis es eine homogene Lösung war, geschüttelt. 4 ml Gelmaterial wurden in einem 15 ml Falcon kurz zentrifugiert (2000 UpM bei 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Gelmaterial wurde zweimal mit 2 ml 0,1 M MOPS-Puffer gewaschen (Zentrifugation, Überstand verwerfen). Affi-Gel 10 wurde mit der Proteinlösung auf einem Schütteltisch inkubiert (1 h bei RT). Das Protein-Gel wurde zentrifugiert (2000 UpM bei 4°C) und der Überstand verworfen. Das Protein-Gel wurde mit 2 ml 0,1 M MOPS-Puffer und 200 µl 1 M Ethanolamine auf einem Schütteltisch inkubiert (1 h bei RT). Das Protein-Gel wurde zentrifugiert (2000 UpM bei 4°C) und der Überstand verworfen. Das Protein-Gel wurde in 2 ml PBS gelöst und in eine leere Polypropylen-Säule überführt. Die Säule wurde mit 10 ml PBS gespült. Die Säule wurde mit 10 ml 20 % Ethanol gespült und mit 5 ml 20 % Ethanol bei 4°C gelagert.

2.2.7.4 Isolation Kollagen-Typ-VII-spezifischer Autoantikörper

Die Kollagen-Typ-VII-spezifische Säule (2.2.7.3) wurde zunächst fünffach mit 10 ml PBS gespült und anschließend mit den Gesamt-IgG-Antikörpern beladen. Der Durchfluss wurde aufgefangen und insgesamt fünf Mal erneut auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mit 50 ml PBS, 25 ml 0,85 M NaCl mit 0,1 % Triton X 100 Lösung und 50 ml PBS gewaschen. Die spezifischen Autoantikörper wurden mit 0,5 ml Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCl, pH 2,8) von der Säule gelöst. Das Eluat wurde in ein 15 ml Falcon, in dem 400 µl 1 M Tris-Base (pH 9,0) zur Neutralisierung des pH Werts vorgelegt wurde, aufgefangen. Die letzten beiden Tropfen wurden für eine photometrische Konzentrationsbestimmung genutzt. Der Eluationsschritt wurde solange wiederholt, bis die spezifischen Autoantikörper vollständig von der Säule gelöst worden waren. Im Eluat wurde der pH auf 7,1 neutralisiert (1 M Tris-Base, pH 9,0). Die Säule wurde mit 50 ml 20 mM Tris (pH 7,5), 50 ml 20 mM Tris mit 0,5 M NaCl (pH 7,5) und 50 ml 20 mM Tris (pH 7,5) gewaschen. Die Säule wurde in 5 ml 20 % Ethanol bei 4°C gelagert. Mittels der Amicon Ultrafilter (50000 NMWL) wurde der Puffer gegen PBS gewechselt (15 min, 5000 UpM bei 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die

spezifischen Autoantikörper in PBS aufgenommen. Die Autoantikörperlösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Die Qualität der Isolation der spezifischen Autoantikörper wurde durch die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) bestimmt. Dazu wurden Verdünnungsreihen eines Kontrollserums (Woche 3 bis 5 nach Krankheitsinduktion), der Gesamt-IgG-Fraktion sowie der spezifischen Autoantikörper angefertigt. 25 µl einer jeden Verdünnung wurden mit einem Gefrierschnitt einer gesunden Maushautprobe inkubiert (45 min bei RT). Die Schnitte wurden mit PBS gewaschen (3 x 5 min) und anschließend mit dem polyklonalen Rabbit Anti-Mouse IgG FITC Antikörper im Dunkeln inkubiert (30 min bei RT). Dann wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen (3 x 5 min). Mit einem Fluoreszenzmikroskop wurde der Titer bestimmt, bei dem noch optisch eine Ablagerung von Autoantikörpern an die dermo-epidermale Junktionszone festzustellen war.

2.2.7.5 Massenspektrometrische Analyse der Glykosylierung

Die massenspektrometrische Untersuchung der Glykane wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mark Ehlers (Institut für Systemische Entzündungsforschung, Lübeck) durchgeführt. Die Proben wurden mit der Endoglycosidase S (EndoS) verdaut, so dass die endständigen Glykane analysiert werden konnten. EndoS spaltet spezifisch das Glykan, das am Asparaginrest des Fc-Fragments gebunden ist, ab (Collin and Olse, 2001; Kaneko et al., 2006; Oefner et al., 2012). Die gewonnenen Zucker wurden über eine Festphasen C18-Extraktion und eine Graphit-Karbonsäule (Alltech, Deerfield, IL) gereinigt. Die Proben wurden gemäß Standardprotokollen für die weitere Verarbeitung im MALDI-TOF Massenspektrometer methyliert. Die Analysespektren wurden mit dem Ultraflex III Massenspektrometer mit Smartbeam Laser (Bruker Daltonics, Billerica, Mass, USA) aufgezeichnet. Das System wurde mit einem Glukosemarker kalibriert. Als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoat verwendet. Die Spektren wurden durch den Reflektor bei positiver Ionisierung mit 3000 Laserschüssen aufgezeichnet. Anhand der Spektren konnten die enthaltenen Zuckerreste identifiziert und auf die Gesamtmenge der Glykane bezogen werden.

2.2.8 Statistische Auswertung

Die Daten wurden in Form von Mittelwert und Standardfehler dargestellt. Der Vergleich zweier unabhängiger Stichproben erfolgte durch den Mann-Whitney-U-Test. Drei oder mehr unabhängige Versuchsgruppen wurden mit der 1-way ANOVA und anschließend dem Dunnett Post-Hoc-Test verglichen. Die Korrelation wurde mit der Spearman-Analyse überprüft. Das Signifikanzniveau wurde in den Abbildungen mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) angegeben. Alle statistischen Tests wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5.0 durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchung der Keimzentrumsbildung im Mausmodell

3.1.1 Induktion von Keimzentren durch Transfer *in vitro* aktivierter Lymphozyten

Lymphozyten wurden aus den beiden Mausstämmen BALB/c und C57BL/6 gewonnen und für drei Tage unter T-zellstimulierenden Bedingungen *in vitro* kultiviert (**Abb. 3–1**). Nach Kultivierung wurden die stimulierten Zellen in naive Empfängertiere des gleichen Mausstamms intravenös transferiert. An Tag sechs wurde die Keimzentrumsbildung in der Milz histologisch untersucht.

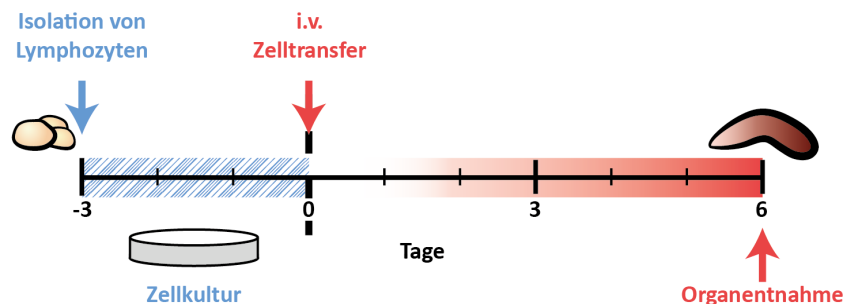


Abb. 3–1: Der Versuchsaufbau zur Induktion von Keimzentren nach Zelltransfer. Drei Tage vor Versuchsbeginn wurden naiven Spendertieren die inguinalen, mesenterialen und poplitealen Lymphknoten entnommen. Aus diesen wurden Lymphozyten gewonnen, die unter T-zellstimulierenden Bedingungen (mit anti-CD3 und anti-CD28 beschichteten Petrischalen) für drei Tage in Kultur genommen wurden. An Tag null wurden diese stimulierten Lymphozyten intravenös naiven Empfängertieren verabreicht. An Tag sechs wurden den Versuchstieren die Milzen entnommen und auf Bildung von Keimzentren hin histologisch untersucht.

Mit der Durchflusszytometrie wurde die Population der Lymphozyten vor und nach der *in vitro* Stimulation bezüglich Wachstum, Vitalität, Aktivierungsstatus und Zellzusammensetzung untersucht (**Abb. 3–2** und **Tab. 3–1**).

Die Betrachtung der Zellpopulationen im *sideward scatter* (SSC) gegen den *forward scatter* (FSC) zeigte die Lymphozyten vor Kultivierung als kleine Zellen, die in einer eng gepackten Population lagen. Durch die stimulierende Kultur war eine Zunahme der Granularität und der Größe zu beobachten (**Abb. 3–2 A**).

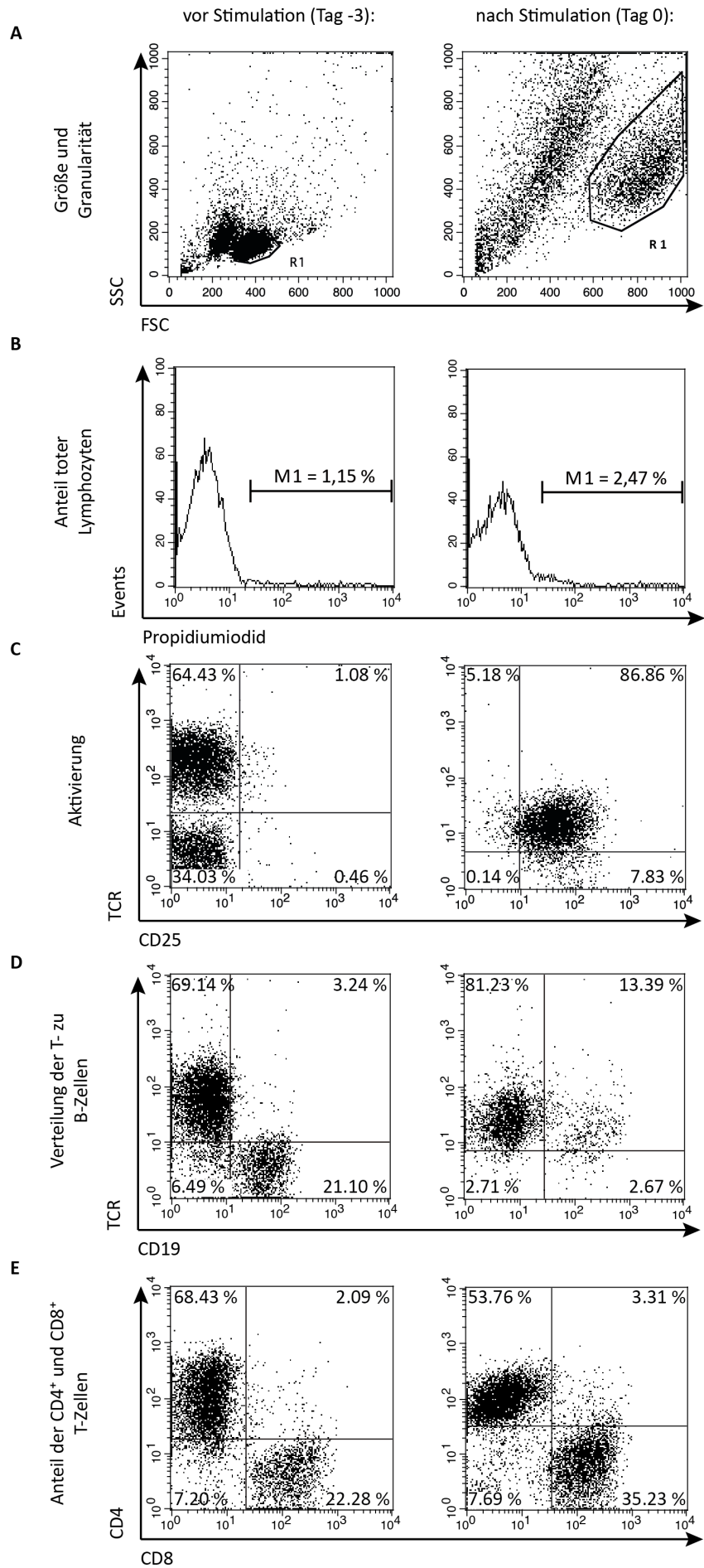


Abb. 3–2: Die durchflusszytometrische Analyse der ruhenden sowie der *in vitro* stimulierten Lymphozyten. Die Lymphozyten wurden direkt nach Isolation (Tag -3) sowie nach stimulierender Kultur (Tag 0) analysiert. Exemplarisch sind hier die Daten eines Experiments für Lymphozyten von BALB/c-Tieren wiedergegeben. A: Ungefärbte Probe mit einem Gate (R1) um die Lymphozytenfraktion. B: Mit einer Propidiumiodid-Färbung wurde die Vitalität der im Gate liegenden Lymphozyten untersucht. M1 gibt den Anteil der toten Zellen wieder. C: Der Erfolg der *in vitro* Stimulation wurde durch eine Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD25 (TCR-PE und CD25-PerCP-Färbung) überprüft. D: TCR-PE- und CD19-Alexa647-Doppelfärbung zur Darstellung der Verteilung von T- und B-Zellen. E: Für die Analyse der T-Zellpopulationen wurde zunächst ein Gate um die TCR-FITC positiven T-Zellen gelegt. Anschließend wurde die T-Zellpopulation mittels CD4-PE und CD8-Alexa647 in die entsprechenden Subpopulationen unterteilt. FSC: *forward scatter*, SSC: *sideward scatter*, TCR: T-Zellrezeptor.

Die Zellen innerhalb der Lymphozyten-Gates waren sowohl vor als auch nach Kultivierung lebendig. Der Anteil der mit Propidiumiodid gefärbten toten Zellen lag bei unter 5 % (**Abb. 3–2 B**). Die Kulturbedingungen führten zu hochaktivierten T-Zellen, gemessen an der Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD25. Zusätzlich konnte nach Kultur eine Herunterregulation des T-Zellrezeptors beobachtet werden (**Abb. 3–2 C**). Die T-zellstimulierenden Bedingungen der Kultur führten zu einer erhöhten Anzahl der T-Zellen, wodurch der Anteil der B-Zellen nach Kultivierung reduziert war. Auch hier war eine reduzierte Expression des T-Zellrezeptors zu beobachten (**Abb. 3–2 D**). Zusätzlich wurde der Anteil CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen innerhalb der T-Zellpopulation betrachtet. Nach Kultivierung sank der Anteil der CD4⁺ T-Zellen, während der Anteil der CD8⁺ T-Zellen zunahm. Dies lässt auf eine erhöhte Proliferation der CD8⁺ T-Zellen schließen (**Abb. 3–2 E**).

Tab. 3–1: Der Vergleich der Lymphozyten vor und nach *in vitro* Stimulation.

	BALB/c-Lymphozyten		C57BL/6-Lymphozyten	
	ruhend [% ± SEM]	aktiviert [% ± SEM]	ruhend [% ± SEM]	aktiviert [% ± SEM]
Vitalität	97,3 ± 0,7	95,5 ± 1,8	97,9 ± 0,8	97,6 ± 0,6
Aktivierung	0,9 ± 0,5	90,0 ± 2,2 **	0,3 ± 0,1	84,4 ± 2,8 **
T-Zellen	71,0 ± 2,7	88,3 ± 3,4 *	68,2 ± 3,2	87,4 ± 1,5 **
B-Zellen	21,1 ± 1,7	12,9 ± 1,9 *	25,2 ± 2,9	9,0 ± 1,0 **
CD4 ⁺ T-Zellen	69,0 ± 1,8	51,8 ± 3,9 **	52,6 ± 4,0	23,3 ± 2,2 **
CD8 ⁺ T-Zellen	23,5 ± 0,3	35,2 ± 0,8 **	36,2 ± 3,7	62,7 ± 2,4 **

Angegeben ist der prozentuale Anteil der im Gate liegenden positiven Lymphozyten. Für die Analyse der CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen wurden nur die TCR-PE positiven Zellen betrachtet. Je Mausstamm sind die Daten auf fünf unabhängige Messungen zurückzuführen. Hier dargestellt als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM). Verglichen wurde der Status der Zellen vor (ruhend) und nach Kultur (aktiviert) mittels Mann-Whitney-U-Test, *p < 0,05; **p < 0,01. Zusätzlich wurde das Signifikanzniveau zwischen den beiden Stämmen untersucht. Ruhende CD4⁺ T-Zellen (**), aktivierte CD4⁺ T-Zellen (**) und aktivierte CD8⁺ T-Zellen (**) waren signifikant verändert zwischen BALB/c und C57BL/6.

Der Vergleich der Lymphozyten vor und nach ihrer Kultivierung zeigte, dass durch die *in vitro* Stimulation die Vitalität der Lymphozyten nicht verändert wurde. In beiden untersuchten Mausstämmen waren über 95 % der Zellen lebendig (**Tab. 3–1**). Vor der Kultur (Tag -3) waren kaum T-Zellen positiv für einen der beiden Aktivierungsmarker (CD69 und CD25). T-Zellen wurden in der Kultur effizient aktiviert. So waren nach Kultivierung 80-90 % der T-Zellen aktiviert (**Tab. 3–1**).

Insgesamt führte die Kultivierung in beiden Mausstämmen zu einem signifikanten Anstieg der T-Zellen. So lagen vor der Kultur die T-Zellen bei etwa 70 % und die B-Zellen bei über 20 % der gesamten im Gate liegenden Zellen. Nach Stimulation wuchs in beiden Mausstämmen die T-Zellpopulation auf etwa 88 % an. Die B-Zellpopulation ging hingegen signifikant zurück. Nach Kultivierung von BALB/c-Lymphozyten lag der Anteil der B-Zellen bei 12,9 % während es bei den C57BL/6-Lymphozyten nur noch 9,0 % waren (**Abb. 3–2 D** und **Tab. 3–1**).

Durch die T-zellstimulierende Kultur wurde in beiden Mausstämmen der Anteil der CD4⁺ T-Zellen reduziert. In BALB/c war eine Reduktion von 69,0 % auf 51,8 % und in C57BL/6 von 52,6 % auf nur noch 23,3 % zu beobachten. Wiederum hatte die CD8⁺ T-Zellpopulation signifikant zugenommen. In BALB/c war ein Anstieg von 23,5 % auf 35,2 % und in C57BL/6 von 36,2 % auf 62,7 % zu beobachten (**Tab. 3–1**). Des Weiteren war hier auch ein signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen zu finden. So war der Anteil der CD4⁺ T-Zellen schon vor der Kultur in den BALB/c-Lymphozyten signifikant höher. Dieser erhöhte Anteil der CD4⁺ T-Zellen blieb auch noch nach der T-zellstimulierenden Kultur erhalten. Die CD8⁺ T-Zellen aus BALB/c wiesen hingegen eine geringere Proliferation auf, was sich in einem signifikant reduzierten Anteil der CD8⁺ T-Zellen verglichen mit C57BL/6 zeigte (**Tab. 3–1** Legende).

Kontrollversuchstiere der Mausstämmen BALB/c beziehungsweise C57BL/6, denen entweder PBS oder ruhende Lymphozyten intravenös verabreicht wurden, bildeten an Tag sechs wenige Keimzentren (**Abb. 3–3 A+C**). Der Transfer *in vitro* stimulierter Lymphozyten führte hingegen in beiden untersuchten Mausstämmen zu einer massiven Bildung von Keimzentren. BALB/c-Tiere bildeten insgesamt deutlich mehr und größere Keimzentren als die C57BL/6-Tiere (**Abb. 3–3 B+D**).

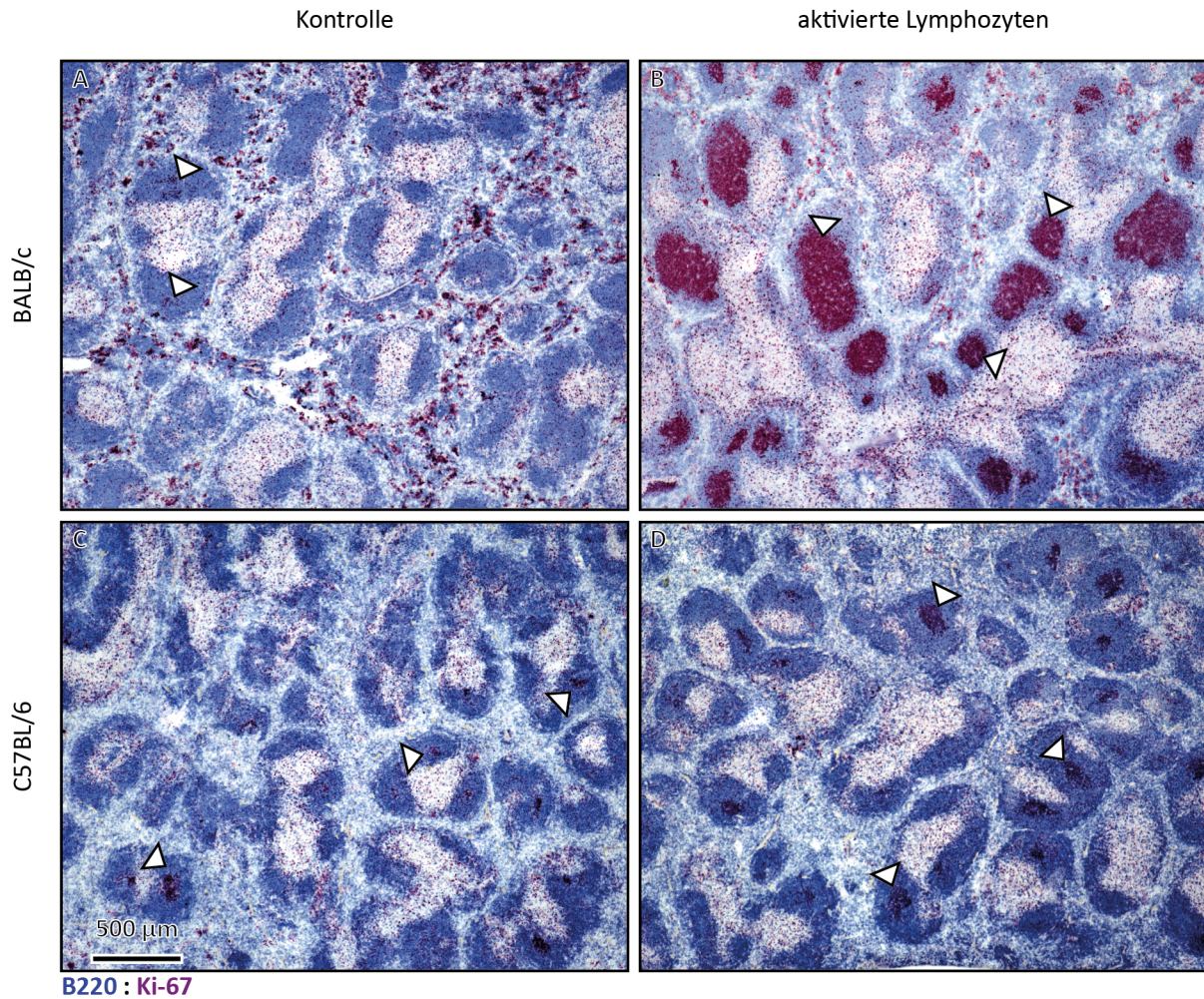


Abb. 3–3: Die Keimzentren entstehen sechs Tage nach Transfer *in vitro* stimulierter Lymphozyten. BALB/c und C57BL/6 Kontrolltieren wurden ruhenden nicht stimulierte Lymphozyten oder PBS intravenös verabreicht (A+C). In Versuchstiere der beiden untersuchten Mausstämme wurden *in vitro* stimulierte Lymphozyten stammspezifisch intravenös transferiert (B+D). Die Milzen wurden sechs Tage nach Transfer entnommen und mit B220 (B-Zellfärbung) und Ki-67 (Proliferationsmarker) gefärbt. Exemplarische Milzaufnahmen von BALB/c (A+B) sowie C57BL/6 (C+D). Pfeilspitzen weisen auf Keimzentren hin. BALB/c (Kontrolle) [5]: n = 18 (21); C57BL/6 (Kontrolle) [4]: n = 20 (20). Die []-Klammern geben die Anzahl der Experimente an.

Die quantitative Auswertung der Keimzentrumsflächen belegt die Beobachtungen. In beiden Mausstämmen konnte eine signifikante Keimzentrumsbildung induziert werden (**Abb. 3–4**). Verglichen mit den C57BL/6-Tieren war die Fläche der induzierten Keimzentren in den BALB/c-Tieren signifikant größer.

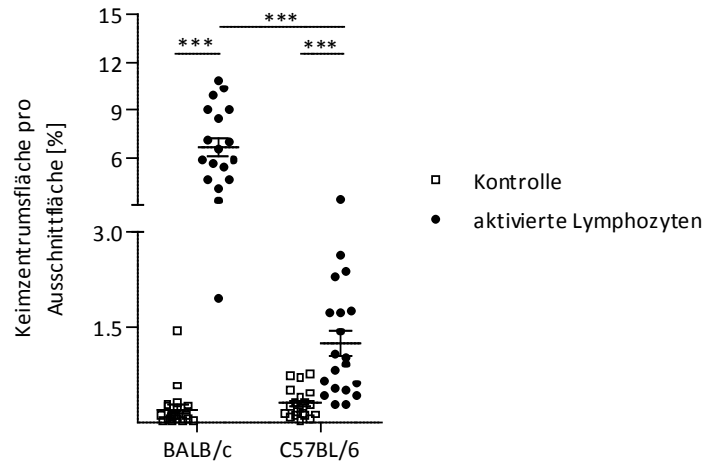


Abb. 3–4: Die Keimzentrumsreaktion ist in BALB/c signifikant stärker ausgeprägt als in C57BL/6. Milzausschnitte wurden mit ImageJ quantitativ vermessen. Dazu wurde der Anteil der Keimzentrumsfläche an der ausgewerteten Ausschnittfläche bestimmt. Zusammengefasst dargestellt sind hier die Daten aller Experimente der Negativkontrolle (Transfer ruhender Lymphozyten oder PBS) und der Positivkontrolle (Transfer aktivierter Lymphozyten). Im späteren Verlauf werden in den verschiedenen Abbildungen nur die Negativ- und Positivkontrolltiere der entsprechenden Experimente dargestellt. BALB/c (Kontrolle) [5]: n = 18 (21); C57BL/6 (Kontrolle) [4]: n = 20 (20). Die []-Klammern geben die Anzahl der Experimente an. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test, ***p < 0,001.

Aufgrund des deutlich stärkeren Signals nach Transfer stimulierter Lymphozyten wurde der BALB/c-Mausstamm gewählt, um das System in der Maus zu etablieren. Wegen des C57BL/6-Hintergrunds der CD154-Knockout-Tiere sowie des kongenen Ly5.1-Mausstamms wurden im späteren Verlauf die entsprechenden Experimente mit den C57BL/6-Tieren durchgeführt.

3.1.2 Entstehung T-zellabhängiger Keimzentren

T-zellunabhängige Keimzentren sind genau wie T-zellabhängige Keimzentren in der Entstehung histologisch nicht voneinander zu unterscheiden. Keimzentren, die jedoch ohne T-Zellhilfe entstehen, brechen an Tag fünf zusammen und gehen durch gesteigerte Apoptose verloren. Innerhalb des Follikels sind in diesen Keimzentren keine T-Zellen nachzuweisen, die zum Erhalt des Keimzentrums beitragen könnten (Vinuesa et al., 2000). Daher wurde zunächst die Dauer der Keimzentrumsreaktion durch das Erstellen einer Kinetik sowie im nächsten Schritt die Anwesenheit von T-Zellen im Keimzentrum untersucht. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfer wurde den Tieren die Milz entnommen und anschließend quantitativ ausgewertet (**Abb. 3–5**). Die induzierten Keimzentren zeigen in der Maus ein Maximum in Anzahl und Ausprägung sechs Tage nach Transfer *in vitro* stimulierter

Lymphozyten. Verglichen mit der jeweiligen zeitlichen Kontrollgruppe bleiben diese Keimzentren bis Tag 14 erhalten.

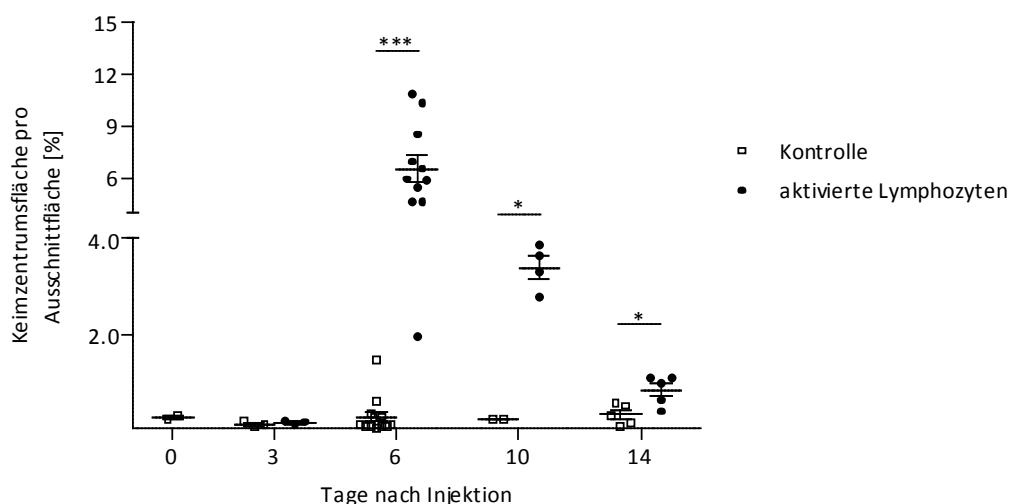


Abb. 3–5: Die Kinetik der Keimzentrumsentstehung in BALB/c-Mäusen. Kontroll- wie Versuchstieren wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfer die Milz entnommen, histologisch untersucht und mittels ImageJ quantitativ ausgewertet. Tag 0 [1]: n = 2; Tag 3 (Kontrolle) [1]: n = 3 (3), Tag 6 (Kontrolle) [3]: n = 11 (13), Tag 10 (Kontrolle) [1]: n = 4 (2) und Tag 14 (Kontrolle) [2]: n = 5 (5). Die []-Klammern geben die Anzahl der Experimente an. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test, *p < 0,05; ***p < 0,001.

In einem T-zellunabhängigen Keimzentrum sind wenige bis keine T-Zellen nachzuweisen, die die Keimzentrumsreaktion unterstützen könnten, während sie in T-zellabhängigen Keimzentren zu finden sind (Vinuesa et al., 2000). Daher wurden die durch Lymphozytentransfer induzierten Keimzentren mit Keimzentren, von denen eine T-Zellabhängigkeit bekannt ist, verglichen. Dazu wurden die in unserem Haus etablierten Tiermodelle genutzt. Im SRBC-Modell (*Sheep red blood cells*) wurden C57BL/6-Tieren 10^7 Schaferythrozyten zunächst intravenös und dann subkutan in die Fußsohle verabreicht. Dies führt zu einer T-zellabhängigen DTH-Reaktion (*delayed-type hypersensitivity*) und der damit verbundenen, typischen Fußschwellung (Kalies et al., 2006, 2008; Stamm, 2011). Im zweiten Modell wurden die Keimzentren untersucht, die nach einer *Leishmania major* Infektion entstehen (Barthelmann, 2011; Barthelmann et al., 2012).

In allen drei Modellen wurde die Anzahl der sich im Keimzentrum befindlichen T-Zellen bestimmt. Sowohl histologisch als auch quantitativ war kein Unterschied festzustellen. Die Keimzentren zeigten eine vergleichbare Struktur und Größe. Die Anzahl der T-Zellen war bezogen auf die Keimzentrumsfläche in den verglichenen Modellen nicht verschieden (**Abb. 3–6**).

ERGEBNISSE

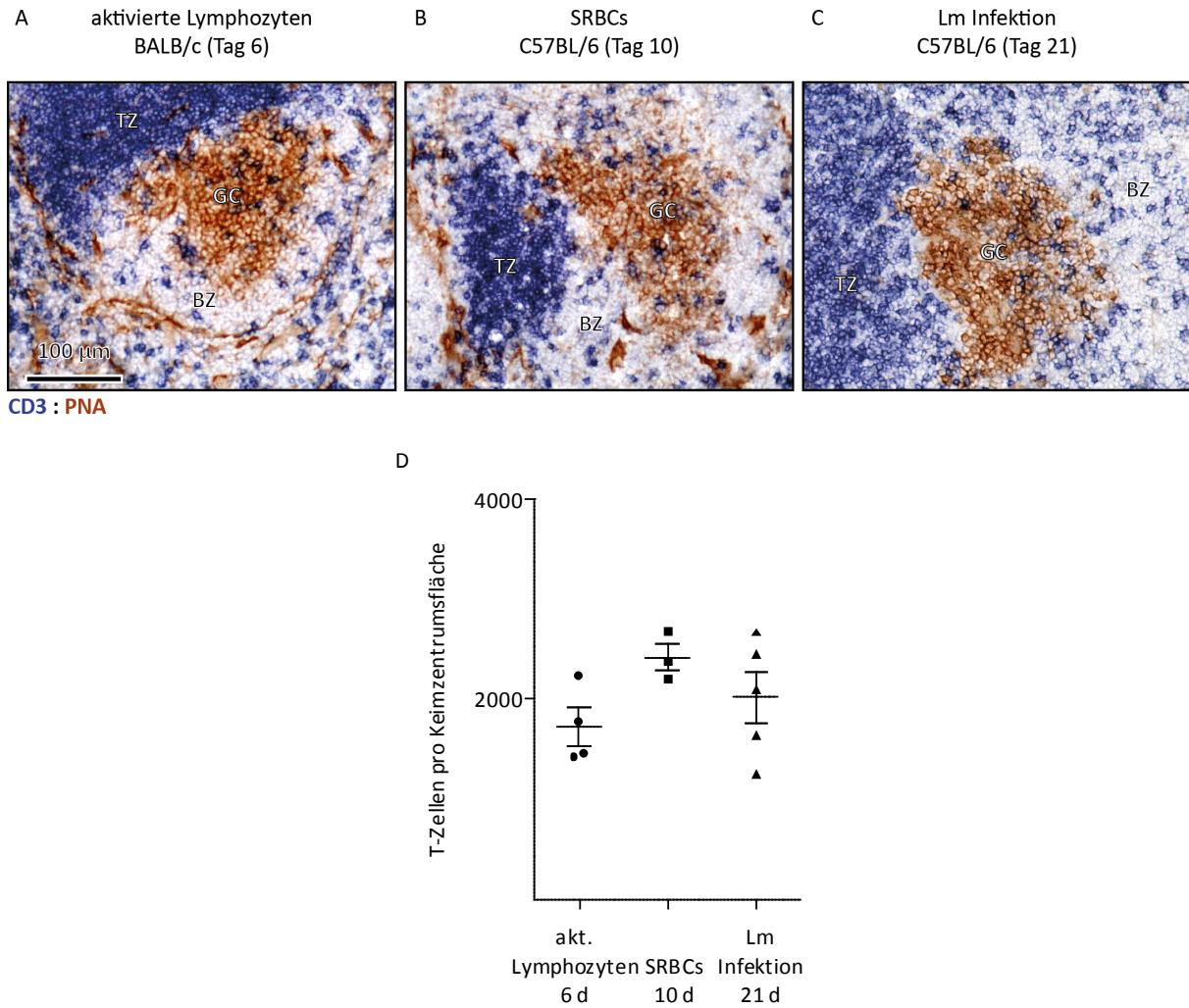


Abb. 3–6: Die Anzahl der T-Zellen innerhalb des Keimzentrums ist in verglichenen Tiermodellen unverändert. Histologische Untersuchung von Keimzentren nach (A) intravenösem Transfer von aktivierter Lymphozyten (Milz, Tag 6) (B) intravenösem Transfer von Schaferythrozyten (Milz, Tag 10; zur Verfügung gestellt von C. Stamm) und (C) einer subkutanen Infektion in den Fuß mit *Leishmania major* (popliteale Lymphknoten, Tag 21; zur Verfügung gestellt von J. Barthelmann). Die Färbung erfolgte mit anti-CD3 sowie PNA. Die Quantitative Analyse erfolgte mit ImageJ. T-Zellen wurden in den Keimzentren gezählt und auf die Keimzentrumsfläche bezogen (n = 3-5). Mittelwerte mit Standardfehler. Der Vergleich mittels 1-way ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test lieferte keine signifikanten Unterschiede. BZ: B-Zellzone, TZ: T-Zellzone, GC: Keimzentrum, SRBC: Sheep red blood cell. Lm: *Leishmania major*.

3.1.3 Keimzentren sind von der Vitalität der transferierten Zellen abhängig

Die *in vitro* Stimulation von Lymphozyten bringt neben den gewünschten stimulierten Zellen auch vermehrt tote Zellen und Fragmente toter Zellen mit sich. Um eine durch Artefakte der Zellkultur verursachte Keimzentrumsbildung auszuschließen, wurden kultivierte Lymphozyten zunächst in drei Fraktionen geteilt. Während die erste Fraktion auf Eis gestellt wurde und unbehandelt blieb, wurde bei den beiden anderen Fraktionen der Anteil toter Zellen erhöht. Hierfür wurde eine dieser Fraktionen einer 45-minütigen Hitzebehandlung bei 90°C unterzogen, während die andere Fraktion mit Ultraschall

behandelt wurde. Beide Behandlungsverfahren hatten zur Folge, dass kaum Zellen innerhalb des Gates R1 lagen, wo gewöhnlich lebende Lymphozyten zu erwarten wären. Die behandelten Fraktionen enthielten nur tote Zellen und Zellfragmente, die außerhalb des Gates detektiert wurden (**Abb. 3–7**).

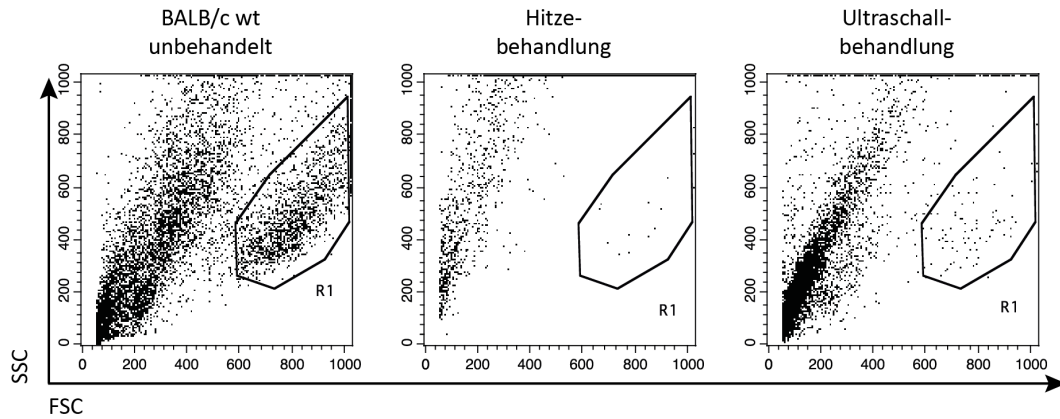


Abb. 3–7: Die Hitze- und Ultraschallbehandlung tötet die Lymphozyten. Die kultivierten Lymphozyten wurden in drei Fraktionen geteilt. Die erste Fraktion wurde auf Eis gestellt und blieb unbehandelt. Die zweite Zellfraktion wurde 45 min bei 90°C in einem Wasserbad inkubiert. Die dritte Fraktion wurde einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Nach der Behandlung erfolgte eine Analyse im Durchflusszytometer. Die lebenden Lymphozyten wurden mit dem Gate R1 markiert. Außerhalb des Gates lagen tote Zellen sowie Zellfragmente. SSC: *sideward scatter*, FSC: *forward scatter*.

Die unbehandelte Fraktion wurde genau wie die *in vitro* getöteten Zellen intravenös naiven Tieren injiziert. Zusätzlich wurde auch eine Fraktion der ruhenden, nicht stimulierten Lymphozyten einer Hitzebehandlung unterzogen. Diese Gruppe diente als Kontrolle, um auszuschließen, dass ruhende tote Lymphozyten Keimzentren induzieren könnten. Weder die hitze- noch die ultraschallbehandelten Lymphozyten konnten Keimzentren induzieren (**Abb. 3–8**). Die Vitalität der Zellen ist für die Induktion der Keimzentren von Bedeutung. Tote Zellen sowie Zellfragmente induzieren keine Keimzentrumsreaktion.

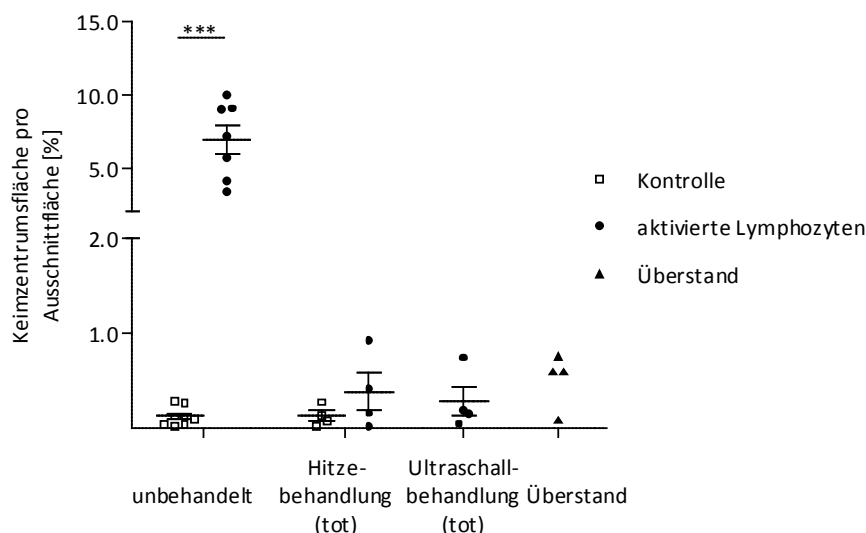


Abb. 3–8: Die Keimzentren werden durch stimulierte und lebende Lymphozyten induziert, nicht jedoch durch tote Zellen. Frisch isolierte sowie *in vitro* stimulierte Lymphozyten wurden intravenös in naive BALB/c-Mäuse injiziert. Die ruhenden sowie stimulierten Zellen wurden durch eine 45-minütige Hitzebehandlung bei 90°C getötet. In einem weiteren Ansatz wurden stimulierte Lymphozyten durch eine Ultraschallbehandlung getötet und ebenfalls transferiert. Zum Ausschluss von in der Kultur freigesetzter extrazellulärer Faktoren wurde Mäusen der Zellüberstand intravenös verabreicht. An Tag sechs nach Transfer wurde den Mäusen die Milz entnommen und die Keimzentrumbildung quantifiziert. Unbehandelte Gruppe (Kontrolle) [2]: n = 7 (8), Hitzebehandlung (Kontrolle) [1]: n = 4 (4), Ultraschallbehandlung [1]: n = 4, Überstand [1]: n = 4. Die []-Klammern geben die Anzahl der Experimente an. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleich mittels 1-way ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test, ***p < 0,001.

Um sicherzustellen, dass außer der Vitalität der Zellen auch ein direkter Zellkontakt für die Induktion der Keimzentren erforderlich war, wurde Mäusen analog zum beschriebenen Transfer der Zellüberstand von stimulierten Lymphozyten intravenös injiziert. Im Zellüberstand enthalten waren von Zellen in Kultur freigesetzte lösliche Faktoren wie etwa Zytokine. Der Transfer der freigesetzten, extrazellulären Faktoren durch den Überstand der Zellkultur führte zu keiner Bildung von Keimzentren (**Abb. 3–8**). Die Keimzentrumbildung erforderte neben der Vitalität der Zellen auch einen direkten Kontakt zwischen den Zellen.

3.1.4 T-Zellen mit begrenztem T-Zellrezeptorrepertoire induzieren eine Keimzentrumreaktion

Bei polyklonal aktivierten T-Zellen ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass sie durch ihren T-Zellrezeptor über MHC-Klasse-II eine passende B-Zelle finden, die sie spezifisch stimulieren und zur Bildung eines Keimzentrums bewegen können. Daher wurde die Rolle des T-Zellrezeptors bei der Interaktion zwischen den polyklonal aktivierten T-Zellen und den B-Zellen und der anschließenden Keimzentrumreaktion mit dem DO11.10-Mausstamm untersucht. In diesem Mausstamm ist das T-Zellrezeptorrepertoire begrenzt. Der Rezeptor

der meisten T-Zellen ist spezifisch gegen das OVA-Peptid₃₂₃₋₃₃₉ (Murphy et al., 1990). Wenn polyklonal aktivierte T-Zellen über ihren T-Zellrezeptor die entsprechenden B-Zellen erkennen, dann sollten T-Zellen mit begrenztem T-Zellrezeptorreperoire aufgrund geringer Möglichkeiten und einer reduzierten Wahrscheinlichkeit weniger passende B-Zellen aktivieren und dadurch auch weniger Keimzentren induzieren.

Bei den Kontrolltieren waren kaum Keimzentren zu beobachten. Der Transfer stimulierter BALB/c-Lymphozyten mit einem normalen T-Zellrezeptorreperoire hatte eine signifikante Keimzentrumsreaktion zur Folge. Eine vergleichbare Intensität in der Keimzentrumsbildung konnte nach dem Transfer stimulierter DO11.10-Lymphozyten mit einem begrenzten T-Zellrezeptorreperoire beobachtet werden (**Abb. 3–9**). In diesem Modell war für die Interaktion zwischen den T- und B-Zellen sowie die Stimulation der B-Zellen zur Keimzentrumsbildung die Spezifität des T-Zellrezeptors ohne Bedeutung. Nach polyklonaler Aktivierung der DO11.10-T-Zellen waren diese genau wie T-Zellen mit einem normalen, uneingeschränkten T-Zellrezeptorreperoire in der Lage, T-Zellrezeptor unabhängig mit B-Zellen in Kontakt zu treten und diese zur Keimzentrumsbildung zu stimulieren. Die Interaktion der aktivierten T-Zelle mit der B-Zelle fand unabhängig von MHC-Klasse-II statt, da B-Zellen ohne ein Antigenpeptid über MHC-Klasse-II den T-Zellen präsentieren zu müssen, durch die aktivierten T-Zellen zur Keimzentrumsbildung stimuliert wurden.

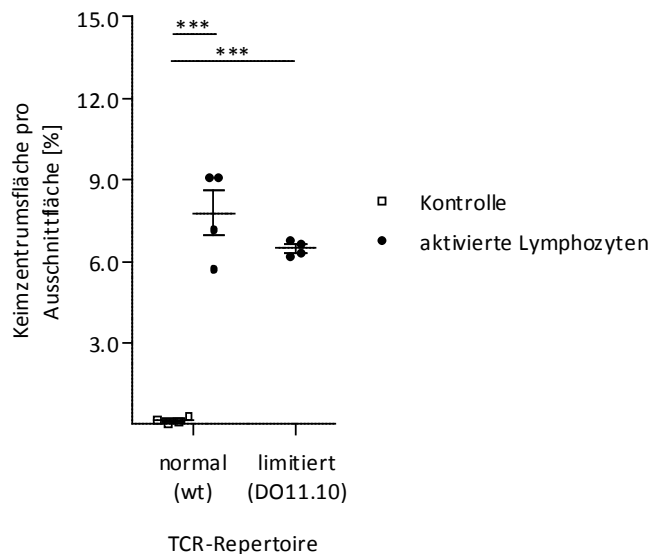


Abb. 3–9: Die Induktion von Keimzentren erfolgte unabhängig vom T-Zellrezeptorreperoire. Kontrolltieren wurde PBS intravenös injiziert. Lymphozyten von wt BALB/c- und DO11.10-Mäusen wurden *in vitro* polyklonal stimuliert und in naive BALB/c-Mäuse transferiert. An Tag sechs nach dem Transfer wurden die Milzen auf ihre Keimzentrumsbildung hin untersucht. Normales TCR-Repertoire (Kontrolle): n = 4 (4), begrenztes TCR-Repertoire: n = 4. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleich mittels 1-way ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test, ***p < 0,001. TCR: T-Zellrezeptor.

3.1.5 Produktion von Autoantikörpern durch Transfer *in vitro* aktivierter Lymphozyten

Für die physiologische Bedeutung des Transfers *in vitro* aktivierter Lymphozyten in naive Versuchstiere wurde eine mögliche Produktion von Autoantikörpern überprüft. Dazu wurde PBS-Kontrolltieren sowie Versuchstieren, denen *in vitro* aktivierte Lymphozyten intravenös injiziert wurden, vor Transfer sowie 21 Tage später Serum entnommen und auf die Anwesenheit von Autoantikörpern hin untersucht. Ein Autoantikörperprofil wurde erstellt, indem die Seren mit verschiedenen auf Mikrochips (Euroimmun) fixierten Substraten inkubiert wurden (2.2.4.2). In Versuchstieren beider Gruppen waren vor dem Transfer keine Autoantikörper nachzuweisen (Abb. 3–10 A+B). Auch 21 Tage nach dem Transfer waren in der PBS-Kontrollgruppe keine Autoantikörper zu finden (Abb. 3–10 C). Im Gegensatz dazu konnten in alle Seren der Versuchstiere, denen aktivierte Lymphozyten transferiert wurden, Autoantikörper gegen zytoplasmatische Proteine nachgewiesen werden (Abb. 3–10 D).

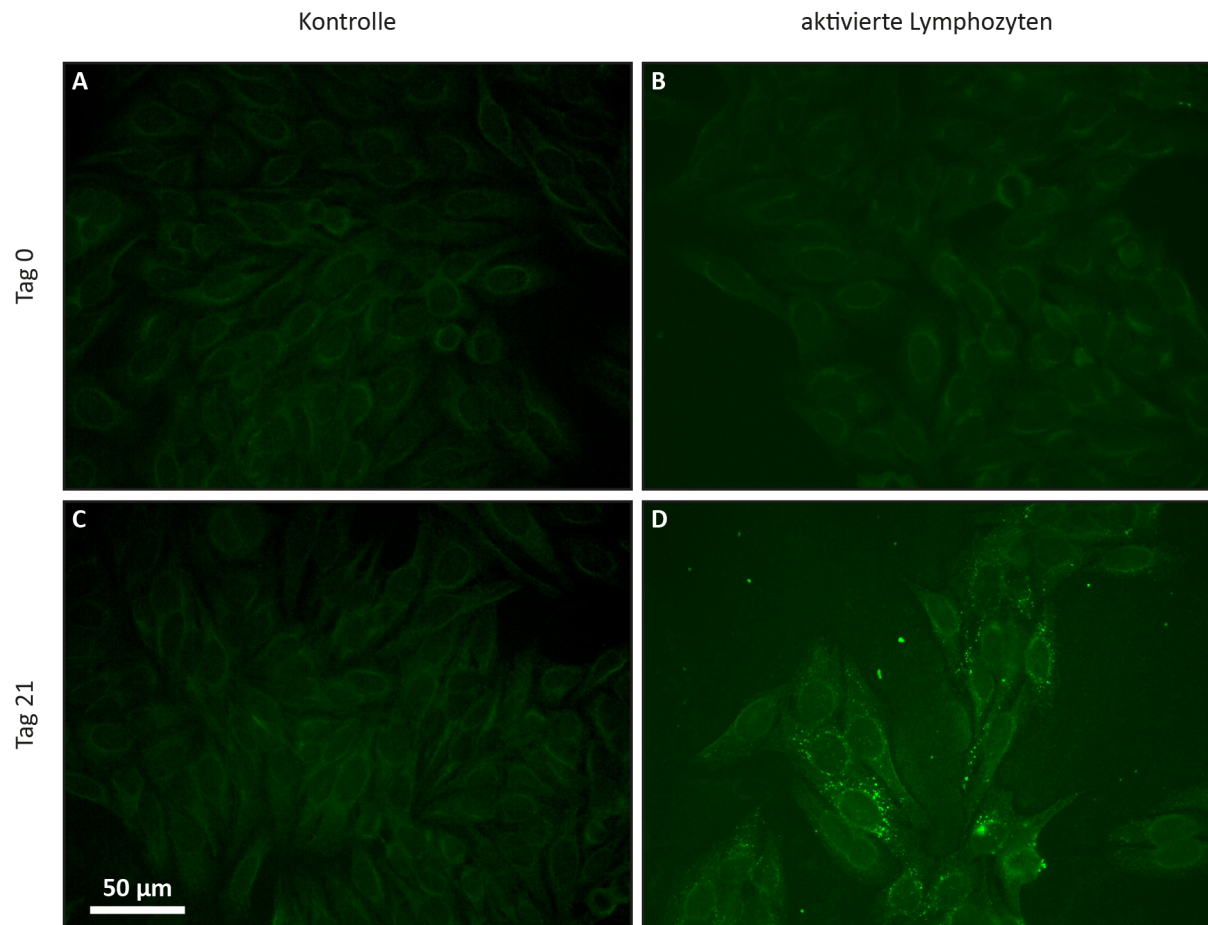


Abb. 3–10: Transfer aktivierter Lymphozyten induziert Produktion von Autoantikörpern. Kontrolltieren wurde PBS intravenös injiziert. In naive Versuchstiere wurden *in vitro* stimulierte Lymphozyten transferiert. An Tag 0 sowie 21 Tage nach Transfer wurde den Tieren Blut entnommen. Das Serum wurde von der Firma Euroimmun auf die Produktion von Autoantikörpern gegen Zellkernproteine sowie auf zytoplasmatische Autoantikörper hin untersucht. n = 10.

3.1.6 CD154-unabhängige Aktivierung der B-Zellen mit anschließender CD154-abhängigen Bildung von Keimzentren

Ein potenter Kandidat bei der Interaktion zwischen T- und B-Zellen ist der Kofaktor CD154. Dieser wird von aktivierten T-Zellen exprimiert und bindet das konstitutiv von B-Zellen exprimierte CD40. Mittels eines CD154-Knockout-Mausstammes konnte die Bedeutung dieses Kofaktors für die Keimzentrumsbildung untersucht werden.

Der Transfer *in vitro* aktivierter CD154-kompetenter Wildtyp-Lymphozyten zurück in naive C57BL/6-Tiere (Wildtyp-Hintergrund) induzierte an Tag sechs eine signifikante Keimzentrumreaktion. Wurden aktivierte CD154-defiziente Lymphozyten in den CD154-kompetenten Hintergrund transferiert, so war ebenfalls eine signifikante Keimzentrumsbildung zu beobachten. Die Keimzentrumsbildung nach dem Transfer von CD154-Knockout-Lymphozyten in naive Wildtyp-Mäuse unterschied sich nicht signifikant von der Keimzentrumsbildung nach einem Wildtyp-in-Wildtyp-Transfer (**Abb. 3–11**).

Diese Keimzentrumsbildung blieb hingegen aus, wenn aktivierte CD154-defiziente Lymphozyten in naive Tiere mit dem CD154-defizienten Hintergrund transferiert wurden (**Abb. 3–11**).

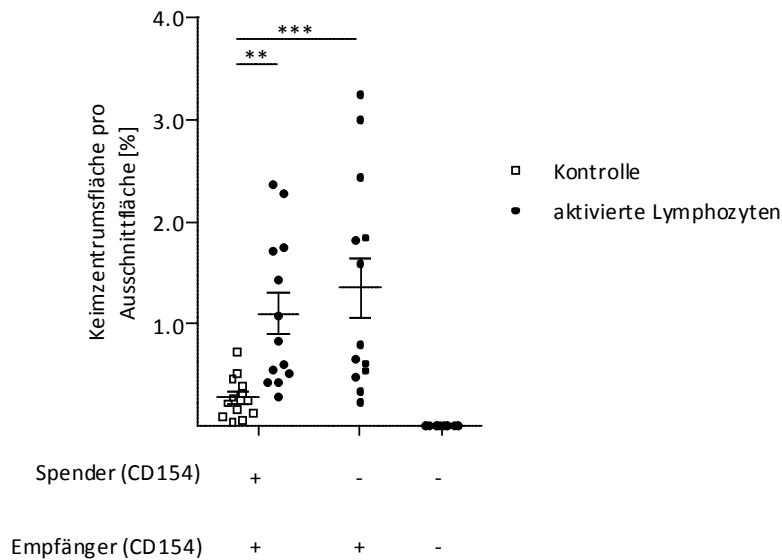


Abb. 3–11: Die Aktivierung von Lymphozyten ist CD154-unabhängig, die Bildung der Keimzentren jedoch CD154-abhängig. Kontrolltieren wurde PBS intravenös injiziert. Lymphozyten von C57BL/6-Wildtyp- und CD154-Knockout-Mäusen wurden *in vitro* stimuliert und in naive C57BL/6- sowie CD154-Knockout-Mäuse transferiert. Versuchstieren wurden an Tag sechs nach Transfer die Milzen entnommen. Untersuchung der Keimzentrumsbildung erfolgte durch eine quantitative Analyse mit ImageJ. wt in wt (Kontrolle) [2]: n = 13 (13), CD154 KO in wt [2]: n = 13, CD154 KO in CD154 KO [2]: n = 12. Die []-Klammern geben die Anzahl der Experimente an. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleich mittels 1-way ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test, **p < 0,01, ***p < 0,001. KO: Knockout, wt: Wildtyp.

Die oben aufgeführten Ergebnisse weisen auf einen Zweischnittmechanismus hin. Im ersten Schritt werden B-Zellen entgegen der ursprünglichen Annahme bereits *in vitro* von den stimulierten T-Zellen CD154-unabhängig aktiviert. Diese B-Zellen besitzen das Potential nach Transfer Keimzentren zu bilden. CD154-defiziente T-Zellen waren in der Lage, B-Zellen zu aktivieren. Nach Transfer in den CD154-kompetenten Hintergrund konnten Keimzentren induziert werden (**Abb. 3–11**). Im zweiten Schritt benötigen die B-Zellen für die Keimzentrumsreaktion Unterstützung von CD154-kompetenten T-Zellen. Wurden die Zellen hingegen in den CD154-defizienten Hintergrund transferiert, so blieb eine Keimzentrumsbildung aus.

3.1.6.1 B-Zellen werden bereits *in vitro* durch T-Zellen aktiviert und zur Keimzentrumsbildung angeregt

Bei einer Aktivierung der B-Zellen bereits *in vitro* sollten separierte und aktivierte T-Zellen nach Transfer zu keiner Keimzentrumsbildung führen. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden zunächst CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen isoliert. Die Reinheit für die CD4⁺ T-Zellen lag bei über 97 % und für die CD8⁺ T-Zellfraktion bei etwa 93 % (**Abb. 3–12**).

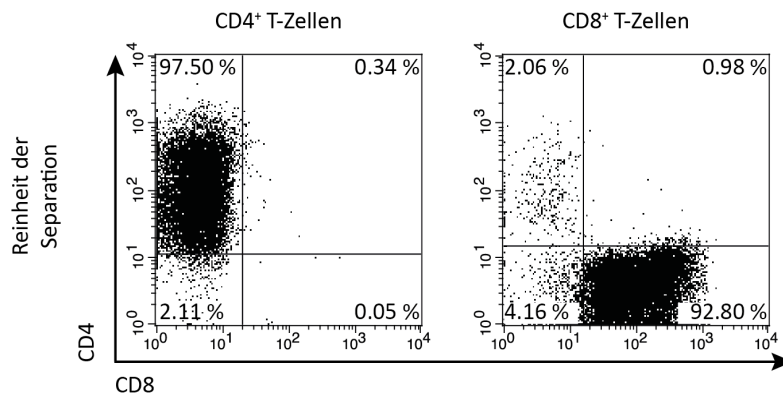


Abb. 3–12: Die Separation der T-Zellfraktionen. Mit der negativen magnetischen Zellseparation wurden reine CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellfraktionen isoliert. Nach der Zellisolation wurde die Reinheit mittels der Durchflusszytometrie untersucht. Nachdem um die TCR-FITC positiven T-Zellen ein Gate gelegt wurde, konnten anschließend die T-Zellen mittels der Färbung mit CD4-PE und CD8-Alexa647 entsprechend in die Subpopulationen aufgetrennt werden.

Nicht separierte Zellen wurden ebenso wie die separierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Kultur genommen. Zur Kontrolle wurden auch die um CD4⁺ beziehungsweise CD8⁺ T-Zellen reduzierten Fraktionen in Kultur genommen.

Verglichen zu PBS-Kontrolltieren induzierten die nicht separierten Lymphozyten eine signifikante Keimzentrumsbildung. Weder $CD4^+$ noch $CD8^+$ T-Zellen waren in der Lage, in naiven Tieren Keimzentren zu induzieren. Diese beiden Gruppen waren von der Kontrollgruppe, der PBS intravenös injiziert wurde, nicht zu unterscheiden. Der Transfer der um $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen reduzierten Zellfraktionen führte zu einer signifikanten Keimzentrumsreaktion, die in ihrer Intensität mit der beobachteten Keimzentrumsbildung nach Transfer nicht separierter Lymphozyten vergleichbar war (**Abb. 3–13**).

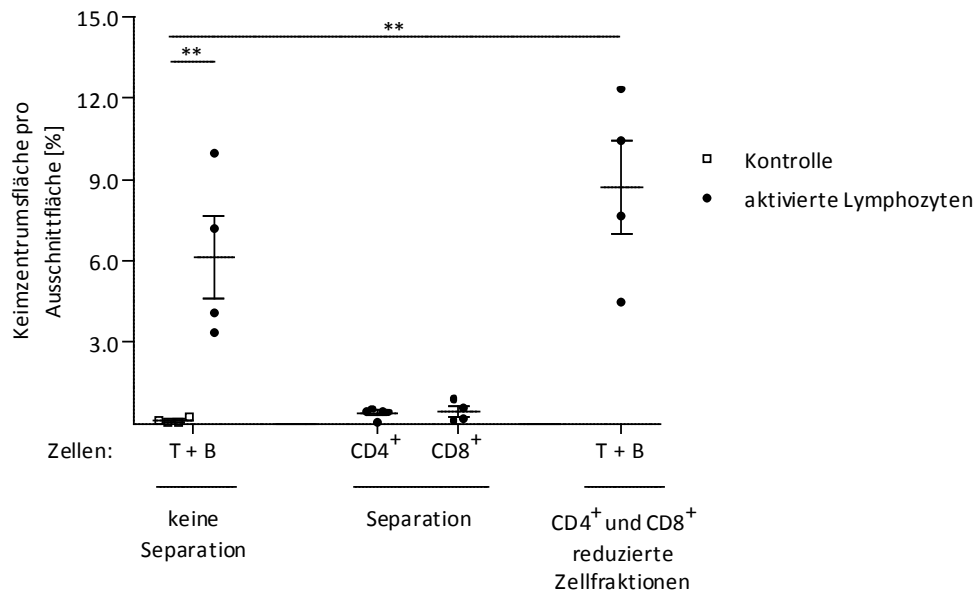


Abb. 3–13: Isolierte T-Zellfraktionen induzieren keine Keimzentren. Kontrolltieren wurde PBS intravenös injiziert. Nicht separierte Lymphozyten, separierte $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellfraktionen (Separation vor Kultur), sowie die um $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen reduzierten Fraktionen (Ergebnis zusammengefasst für die beiden um $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen reduzierten Fraktionen) wurden nach *in vitro* Stimulation in naive BALB/c-Mäuse transferiert. An Tag sechs wurden die Milzen für die Analyse der Keimzentrumsentwicklung entnommen. n = 4. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleich mittels 1-way ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test, $**p < 0,01$. T: T-Zelle, B: B-Zelle.

Die separierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellfraktionen induzierten nach Transfer keine zusätzlichen Keimzentren. Diese beiden Populationen unterschieden sich in einem wesentlichen Aspekt von nicht separierten, keimzentrumsbildenden Lymphozyten. Beide Fraktionen enthielten keine B-Zellen, die bereits *in vitro* aktiviert werden könnten, um nach Transfer Keimzentren zu bilden.

Um zu zeigen, dass die B-Zellen *in vitro* durch die T-Zellen aktiviert werden, wurden zusätzlich auch B-Zellen separiert. Die Reinheit der B-Zellfraktion lag bei etwa 95 % (**Abb. 3–14 A**). Im Gegensatz zu nicht separierten Lymphozyten waren die separierten B-Zellen nach Zelltransfer nicht in der Lage Keimzentren auszubilden (**Abb. 3–14 B**). Fehlten die T-Zellen in

Kultur, so wurden die B-Zellen nicht aktiviert und konnten nach Transfer keine Keimzentren bilden.

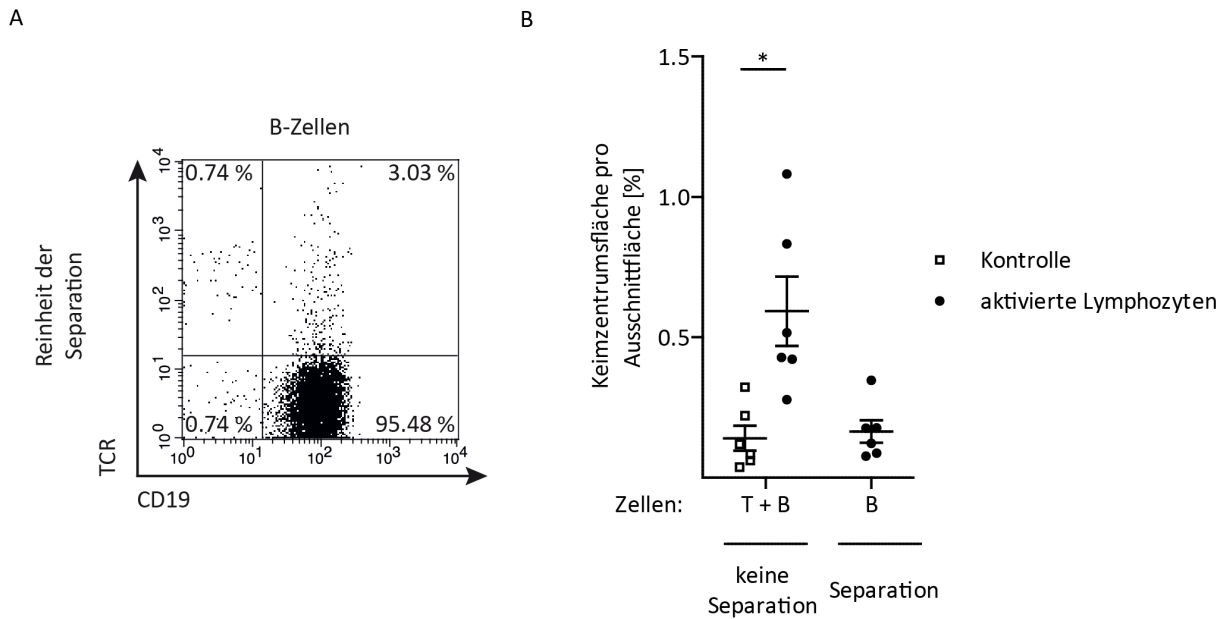


Abb. 3–14: Die B-Zellen müssen in Kultur durch T-Zellen aktiviert werden, um Keimzentren zu bilden. Kontrolltieren wurde PBS intravenös injiziert. Nicht separierte Lymphozyten sowie separierte B-Zellen (Separation vor Kultur) wurden nach *in vitro* Stimulation in naive C57BL/6-Mäuse transferiert. Sechs Tage später wurden die Milzen für die Analyse der Keimzentrumsentwicklung entnommen. A: Reinheit der Separation. B: Keimzentrumsentwicklung. n = 6. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleich mittels 1-way ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test, *p < 0,05.

In Kultur werden die B-Zellen durch die stimulierten T-Zellen aktiviert und dazu angeleitet, nach Zelltransfer im Empfängertier Keimzentren zu bilden. Um diese Aussage zu bestätigen, wurde der kongene Mausstamm C57BL/6Ly5.1 benutzt. Dieser Stamm unterscheidet sich vom WildtypvC57BL/6 in der Variante des CD45vProteins. Leukozyten von Wildtyp-Mäusen exprimieren CD45.2 auf ihrer Plasmamembran, während die Leukozyten von C57BL/6Ly5.1-Tieren CD45.1 tragen. Auf diese Weise lassen sich die Zellen des C57BL/6Ly5.1-Mausstamms nach Transfer in den Wildtyp histologisch verfolgen.

Der Transfer von Wildtyp- aber auch von C57BL/6Ly5.1-Lymphozyten induzierte im naiven Tier Keimzentren. Diese waren in der B220- und Ki-67-Doppelfärbung nicht voneinander zu unterscheiden (**Abb. 3–15 A+C**). Eine Betrachtung der B220- und CD45.1-Doppelfärbung bewies den Ursprung der Keimzentren. Während nach Transfer von Wildtyp-Lymphozyten die keimzentrumsbildenden B-Zellen negativ für die CD45.1-Färbung blieben, so waren nach Transfer der kongenen Lymphozyten die keimzentrumsbildenden B-Zellen auch CD45.1-positiv (**Abb. 3–15 D**). Die gebildeten Keimzentren wurden ausgezählt und der Ursprung durch den Vergleich der beiden Doppelfärbungen festgelegt. Vom

endogenen Anteil wurde die durchschnittliche Anzahl von Keimzentren aus Kontrolltieren (Hintergrund der Keimzentrensbildung) subtrahiert. Der Anteil an exogen gebildeten Keimzentren nach Transfer von C57BL/6Ly5.1-Lymphozyten lag bei den zehn untersuchten C57BL/6-Tieren bei $81,4 \pm 4,7 \%$.

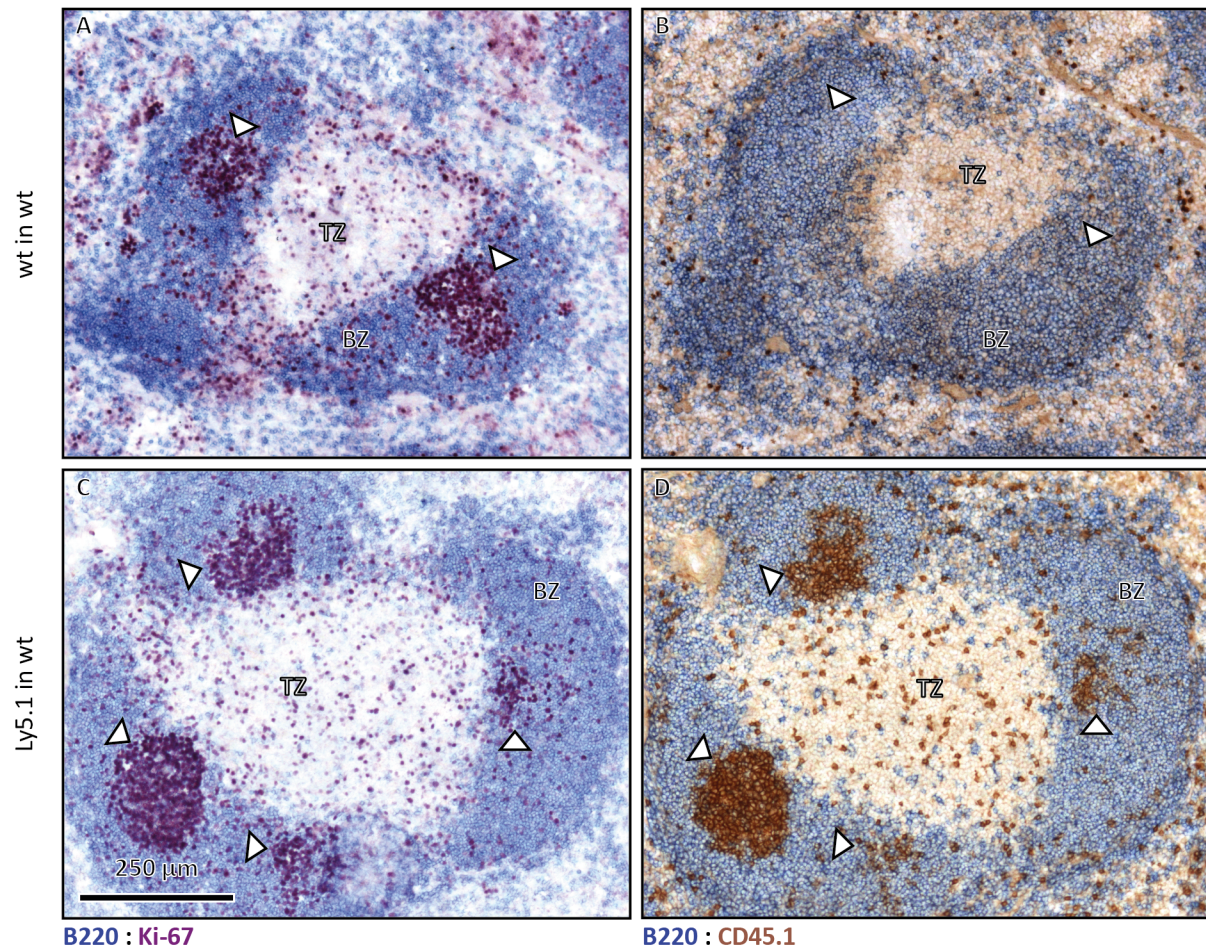


Abb. 3–15: Die Keimzentren werden durch exogen transferierte B-Zellen gebildet. *In vitro* stimulierte Lymphozyten von C57BL/6 beziehungsweise dem kongenen Mausstamm C57BL/6Ly5.1 wurden in naive C57BL/6-Mäuse transferiert. Sechs Tage nach Transfer erfolgte die Organentnahme. A+C: Färbung mit B220 und Ki-67. B+D: Färbung mit B220 und CD45.1. Braun angefärbt wurden die transferierten Zellen des C57BL/6Ly5.1 Mausstamms. Pfeilspitzen weisen auf Keimzentren hin. wt in wt [2]: n = 10, Ly5.1 in wt [2]: n = 10. Die []-Klammern geben die Anzahl der Experimente an. BZ: B-Zellzone, TZ: T-Zellzone, GC: Keimzentrum.

Um diesen Befund zu bestätigen und zu zeigen, dass die B-Zellen *in vitro* von T-Zellen unabhängig von CD154 aktiviert werden und Keimzentren bilden, wurden Lymphozyten vom CD154-Knockout-Stamm *in vitro* stimuliert und in den C57BL/6Ly5.1-Mausstamm transferiert. Dieser Zelltransfer induzierte eine Keimzentrensbildung. Milzschnitte dieser Versuchstiere wurden mit einer B220- und CD45.1-Doppelfärbung gefärbt. In diesem Versuchsansatz wurden alle endogenen Zellen mit der CD45.1-Färbung braun angefärbt, während die exogenen B-Zellen nur blau (B220) angefärbt wurden. Die Mehrzahl der

gebildeten Keimzentren war bei den sechs untersuchten Versuchstieren mit einem Anteil von $67,0 \pm 13,1$ % exogenen Ursprungs (**Abb. 3–16**).

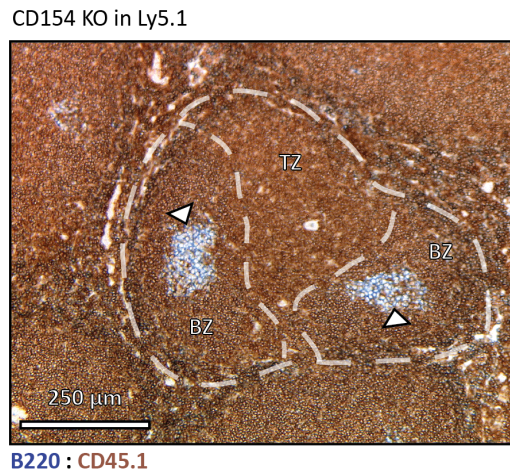


Abb. 3–16: Die gebildeten Keimzentren sind größtenteils exogenen Ursprungs. *In vitro* stimulierte Lymphozyten von CD154-Knockout-Mäusen wurden in naive kongene C57BL/6Ly5.1-Mäuse intravenös transferiert. Milzen wurden an Tag sechs nach Transfer entnommen und histologisch mit B220 und CD45.1 gefärbt. Keimzentrumsformende exogene B-Zellen wurden nur blau (B220) gefärbt, während alle anderen endogenen Zellen zusätzlich braun (CD45.1) angefärbt wurden. Pfeilspitzen weisen auf Keimzentren hin. n = 6. BZ: B-Zellzone, TZ: T-Zellzone.

3.1.6.2 Ruhende CD154-kompetente $CD4^+$ T-Zellen leisten in CD154-defizienten Tieren Hilfe bei der Keimzentrumsbildung

In vitro aktivierte B-Zellen scheiterten daran in CD154-defizienten Versuchstieren Keimzentren zu bilden (**Abb. 3–11**). Daher wurden an Tag -2 ruhende CD154-kompetente $CD4^+$ T-Zellen des kongenen C57BL/6Ly5.1-Mausstamms in CD154-defiziente Tiere transferiert. Wurden anschließend aktivierte CD154-defiziente Lymphozyten transferiert, so konnten in drei von sieben Tieren Keimzentren beobachtet werden. Nun waren *in vitro* aktivierte B-Zellen auch in CD154-defizienten Tieren in der Lage, Keimzentren zu bilden. Innerhalb dieser Keimzentren konnten die zuvor injizierten CD154-kompetenten $CD4^+$ T-Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 3–17**).

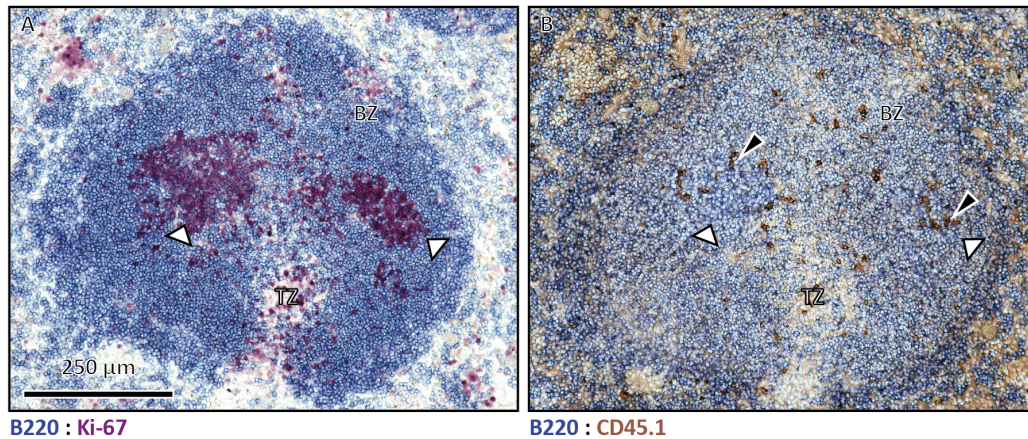


Abb. 3–17: Ruhende CD154-kompetente CD4⁺ T-Zellen leisten Hilfe bei der Bildung von Keimzentren in CD154-defizienten Tieren. Ruhende CD154-kompetente Lymphozyten (C57BL/6Ly5.1) wurden an Tag -2 in naive kongene CD154-Knockout-Mäuse intravenös transferiert. An Tag 0 wurden zusätzlich *in vitro* stimulierte Lymphozyten von CD154-Knockout-Mäusen transferiert. Sechs Tage nach Transfer erfolgte die Organentnahme. Bei drei von sieben Tieren konnten Keimzentren induziert werden. A: Färbung mit B220 und Ki-67. B: Färbung mit B220 und CD45.1. Braun angefärbt wurden die transferierten Zellen des C57BL/6Ly5.1 Mausstamms. Weiße Pfeilspitzen markieren die Position von Keimzentren, während schwarze Pfeilspitzen auf die transferierten kongenen Zellen deuten. BZ: B-Zellzone, TZ: T-Zellzone.

3.1.7 Zusammenfassung zum Mechanismus der Keimzentrumsbildung

Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* polyklonal aktivierte T-Zellen, unabhängig von MHC-Klasse-II und CD154, B-Zellen stimulieren können. Diese B-Zellen bilden nach intravenösem Transfer *in vivo* in Abhängigkeit von CD154 Keimzentren aus. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass für die Aktivierung der B-Zelle und für die Hilfe bei der Bildung eines Keimzentrums zwei verschiedenen T-Zellen verantwortlich sein können. Die Keimzentrumsbildung blieb aus, wenn die aktivierten B-Zellen in einen CD154-Knockout-Hintergrund transferiert wurden. Die Keimzentrumsbildung konnte jedoch gerettet werden, wenn diesen Tieren zuvor ruhende CD154-kompetente T-Zellen zugeführt wurden. Diese antigenunabhängig aktivierten Keimzentren resultierten in einer Produktion von Autoantikörpern.

3.2 Modulation einer Autoimmunkrankheit

Die Epidermolysis bullosa acquisita ist eine T-zellabhängige, autoantikörpervermittelte Autoimmunkrankheit, die im Tiermodell reproduziert werden kann. Eine Immunisierung mit dem rekombinanten Kollagen-Typ-VII-Fragment und dem Adjuvans Titermax führt zu einer T_H1 -Immunantwort mit Produktion pathogener Autoantikörper der IgG2-Subklasse, die das Komplement aktivieren und damit die Entzündungskaskade starten. Durch den Modulationsansatz sollten Autoantikörper der IgG1-Subklasse induziert werden, die das gleiche Antigen binden, jedoch nicht komplementaktivierend wirken. Dadurch sollte der pathogene Phänotyp in der Maus inhibiert werden.

3.2.1 Vorbehandlung verhindert die Epidermolysis bullosa acquisita

Für die Modulation der Epidermolysis bullosa acquisita wurde das Adjuvans Aluminiumhydroxid verwendet, welches primär eine T_H2 -Immunreaktion mit vermehrter Produktion von Autoantikörpern der nicht komplementbindenden IgG1-Subklasse induziert. Durch eine Vorbehandlung vor der Krankheitsinduktion sollten diese spezifischen Autoantikörper in der Maus induziert werden. Ihre Bindung an die Haut sollte die Bindung pathogener Autoantikörper der IgG2-Subklasse nach Krankheitsinduktion in Woche 0 verhindern (**Abb. 3–18**).

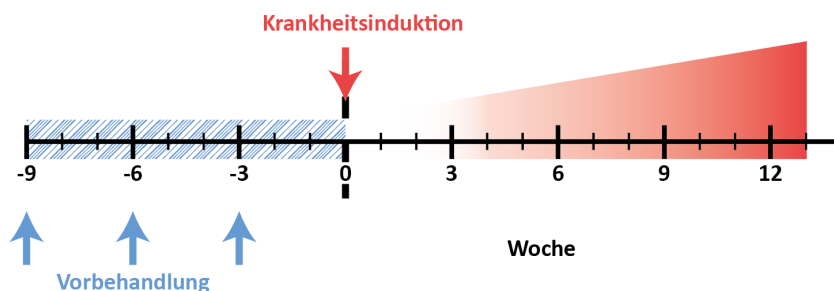


Abb. 3–18: Der Versuchsaufbau zur Modulation der Epidermolysis bullosa acquisita. In der Woche -9, -6 sowie -3 erfolgte eine Vorbehandlung der Versuchstiere. Anschließend wurde in Woche 0 die experimentale Epidermolysis bullosa acquisita induziert. Die Tiere wurden mit 60 μg mCol7C-GST im Adjuvans Titermax immunisiert. Über die folgenden 13 Wochen wurde der Krankheitsverlauf beobachtet. Dazu wurde wöchentlich die Körperoberfläche der Tiere nach auftretenden Krankheitssymptomen untersucht. Alle zwei Wochen wurde Blut entnommen und zum Endzeitpunkt wurden diverse Organe wie Haut und Lymphknoten für Folgeuntersuchungen entnommen.

Als Positivkontrolle wurden Mäuse in einem Dreiwochenintervall drei Mal (Woche -9, Woche -6 und Woche -3) mit PBS vorbehandelt. Nach Krankheitsinduktion in Woche 0 entwickelten die Versuchstiere den Phänotyp der Epidermolysis bullosa acquisita. In

Woche 3 zeichnete sich dieser durch Bildung von Blasen und Läsionen zunächst an den Ohren sowie an den Hinterbeinen aus. Ab Woche 5 waren Augen und der Bereich um die Barthaare betroffen. Um die Woche 5-7 traten Schuppen im Kopf- und Nackenbereich sowie am gesamten Torso auf. Nacken und Kopf sowie Bereiche am Bauch in der Nähe der Hinterbeine konnten von Haarverlust betroffen sein. Heilung war mit Narbenbildung verbunden (**Abb. 3–19 A+B**).

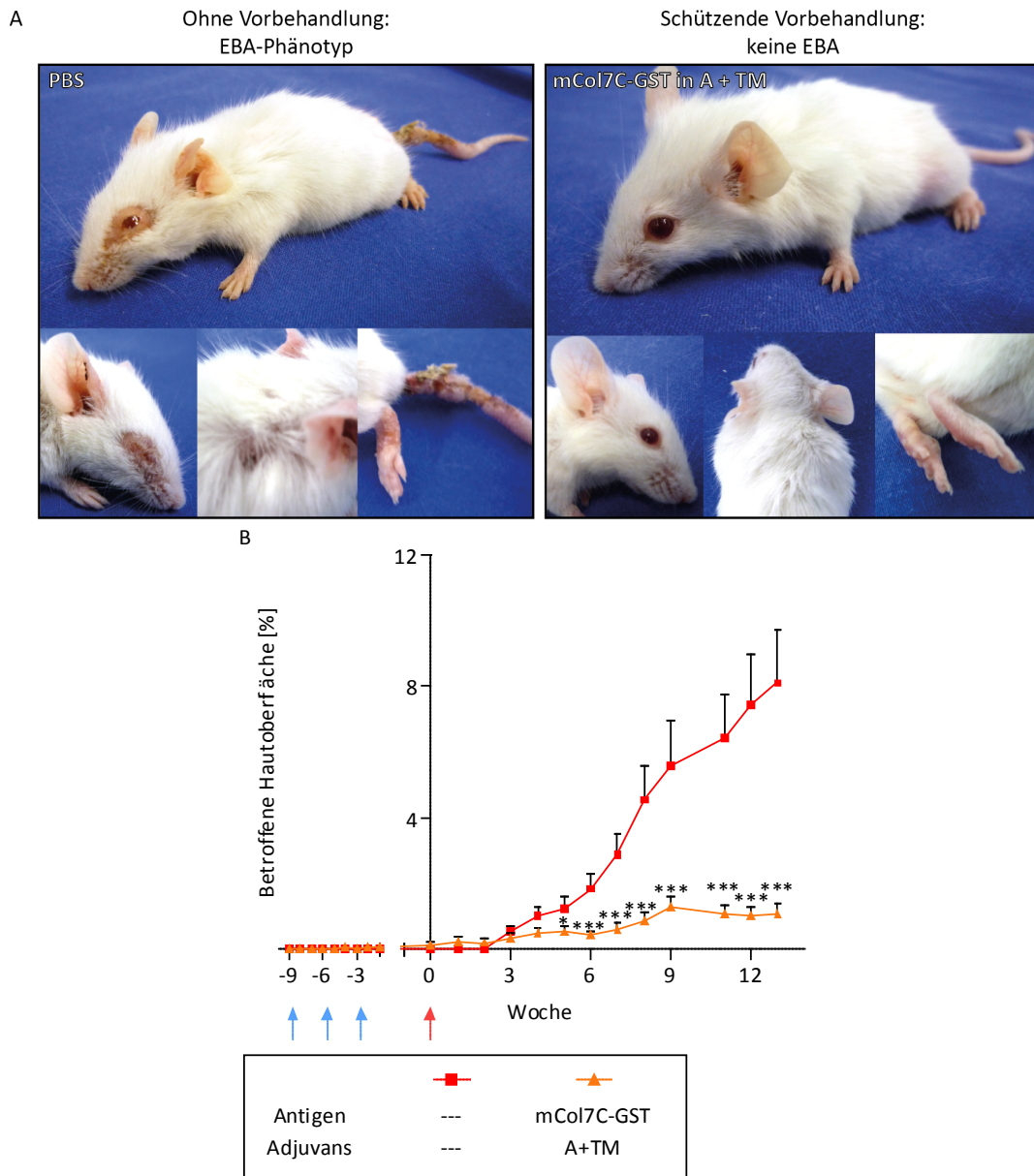


Abb. 3–19: Der EBA-Phänotyp kann durch eine Vorbehandlung mit einem Antigen verhindert werden. In Woche -9, -6 und -3 wurden Versuchstiere vorbehandelt (blauer Pfeil) und in Woche 0 wurde die Krankheit induziert (roter Pfeil). Die Vorbehandlung erfolgte mit PBS oder mit murinem, rekombinanten Kollagen-Typ-VII (mCol7C-GST) in Alum und Titermax. A: Repräsentatives Versuchstier einer jeden Gruppe. B: Krankheitsverlauf in Prozent der betroffenen Hautoberfläche. PBS-Gruppe [2]: n = 13, mCol7C-GST-Gruppe [2]: n = 18. Die []-Klammern geben die Anzahl der Experimente an. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test, *p < 0,05; ***p < 0,001. A: Aluminiumhydroxid, mCol7C: murines C-Fragment von Kollagen-Typ-VII mit GST-Tag, GST: Glutathion-S-Transferase, TM: Titermax.

In Versuchstieren der zweiten Gruppe sollte ein spezifischer Schutz durch die Induktion von nicht komplementaktivierenden und damit auch nicht pathogen wirkenden IgG1-Autoantikörpern induziert werden. Sie wurden mit murinem Kollagen-Typ-VII in einer Kombination der Adjuvantien Aluminiumhydroxid und Titermax vorbehandelt. Die Vorbehandlung war erfolgreich. Diese Versuchstiere blieben phänotypisch gesund und entwickelten keine Epidermolysis bullosa acquisita. Der induzierte Schutz blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum erhalten (**Abb. 3–19 A+B**).

Die mit PBS vorbehandelten Tiere wiesen nach Krankheitsinduktion hohe Autoantikörpertiter der IgG1-, IgG2b- und IgG2c-Subklasse im Blut auf. Die Vorbehandlung mit Kollagen-Typ-VII führte hingegen zu einer niedrigeren Produktion von Autoantikörpern. Verglichen mit der erkrankten PBS-Kontrollgruppe ging die schützende Vorbehandlung mit einer signifikanten Reduktion der IgG1-Autoantikörper einher. Auch die Titer der pathogenen Autoantikörper der IgG2b- und IgG2c-Subklasse waren im Blut reduziert (**Abb. 3–20**).

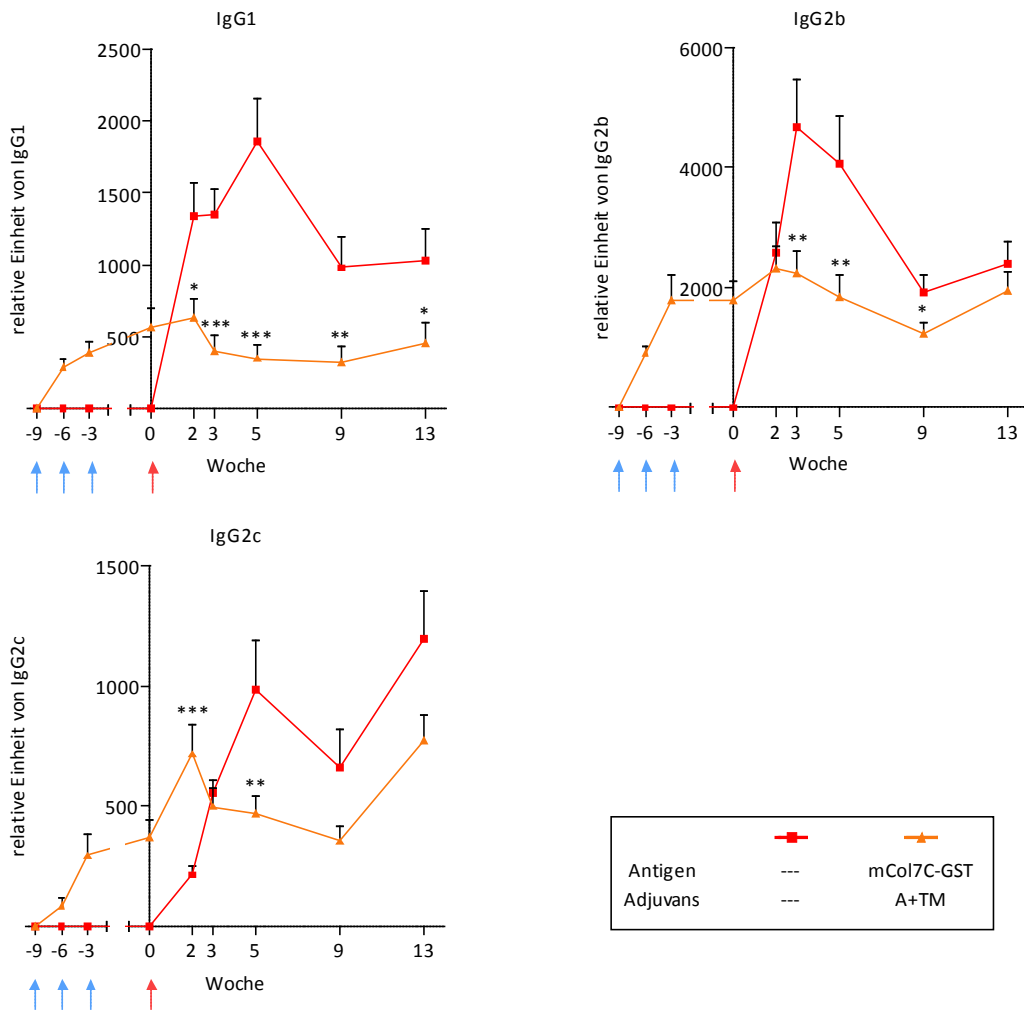


Abb. 3–20: Vorbehandlung mit Kollagen-Typ-VII senkt die Autoantikörper-Titer im Blut. Mit einem Kollagen-Typ-VII-spezifischen ELISA wurden die IgG-Subklassen im Plasma quantifiziert und als Kinetik dargestellt. PBS-Gruppe [2]: n = 13, mCol7C-GST-Gruppe [2]: n = 18. Die []-Klammern geben die Anzahl der Experimente an. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test, *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. A: Aluminiumhydroxid, mCol7C: murines Kollagen-Typ-VII, GST: Glutathion-S-Transferase, TM: Titermax.

Die Hypothese zur Induktion nicht komplementaktivierender Autoantikörper der IgG1-Subklasse wurde damit widerlegt. Entgegen der Annahme konnte durch die Vorbehandlung kein erhöhter Titer der schützenden IgG1-Autoantikörper im Blut erzielt werden.

Um die Spezifität der schützenden Vorbehandlung zu überprüfen, wurden Versuchstiere mit EBA-unabhängigen Antigenen vorbehandelt. Verwendet wurden hierzu die Peptide Glutathion-S-Transferase (GST) und Ovalbumin (OVA). Des Weiteren erfolgte eine Vorbehandlung nur mit Adjuvantien, um den Effekt dieser auf den Krankheitsverlauf zu überprüfen. Als Positivkontrolle wurden Versuchstiere erneut nur mit PBS vorbehandelt. Die Krankheitsinduktion in Woche 0 resultierte im erwarteten Krankheitsbild (**Abb. 3–21 A**).

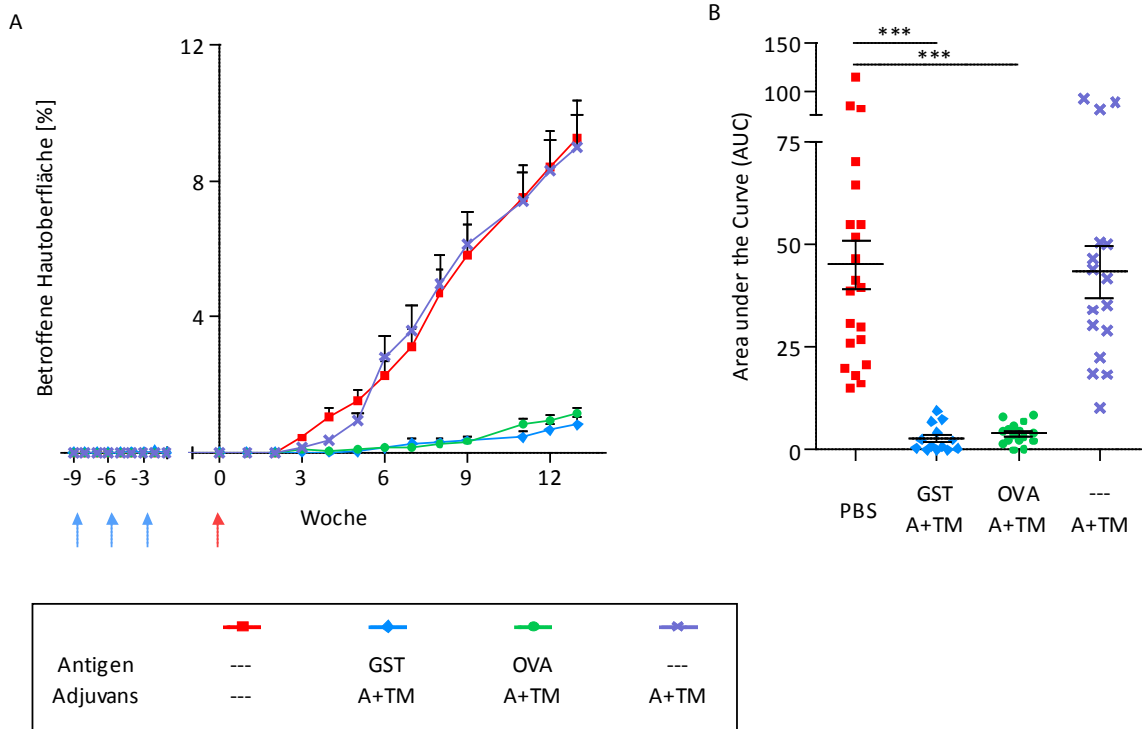


Abb. 3–21: Der Schutz durch Vorbehandlung mit Ovalbumin, einem EBA-unabhängigen Protein. Die Versuchstiere wurden vorbehandelt mit PBS sowie mit GST oder Ovalbumin (OVA) in Alum und Titermax sowie Alum und Titermax ohne Antigen. Dargestellt sind der Krankheitsverlauf (A) sowie die *Area under the Curve* (B). PBS-Gruppe [3]: n = 21, GST-Gruppe [2]: n = 13, OVA-Gruppe [2]: n = 16, A+TM-Gruppe [2]: n = 16. Die []-Klammern geben die Anzahl der Experimente an. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleich mittels 1-way ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test, ***p < 0,001. A: Aluminiumhydroxid, mCol7C: murines Kollagen-Typ-VII, GST: Glutathion-SvTransferase, TM: Titermax.

In zwei Versuchsgruppen wurden Tiere vorbehandelt mit GST sowie mit Ovalbumin in Aluminiumhydroxid und Titermax. Sowohl die Vorbehandlung mit GST als auch mit Ovalbumin zeigte einen schützenden Effekt und verhinderte bei den Versuchstieren den EBA-typischen Krankheitsverlauf. Die Vorbehandlung mit GST sowie mit Ovalbumin hatte einen vergleichbaren schützenden Effekt wie die Vorbehandlung mit Kollagen-Typ-VII in Aluminiumhydroxid und Titermax (**Abb. 3–20** und **Abb. 3–21**). Nur vereinzelt waren Merkmale der Erkrankung festzustellen. Zentrale Körperpartien wie Ohren, Nacken und Hinterbeine blieben, verglichen mit der erkrankten Kontrollgruppe (PBS), ohne Befund. Einzig Läsionen im Bereich direkt um die Augenpartie sowie vereinzelte Schuppen am Körper konnten beobachtet werden. Auch offene und nässende Wunden blieben aus. Der Vergleich zur erkrankenden Versuchsgruppe durch die *Area under the curve* (AUC) zeigte eine signifikante Reduktion im Krankheitsverlauf (**Abb. 3–21 A+B**).

Erfolgte die Vorbehandlung hingegen mit Adjuvantien, aber ohne ein Proteinantigen, so blieb der schützende Effekt aus. Die Tiere bildeten dann die EBA-typischen

Krankheitsmerkmale aus. Diese Versuchsgruppe war im Hinblick auf die Pathogenese nicht zu unterscheiden von der erkrankenden Kontrollgruppe (**Abb. 3–21 A+B**). Dabei unterschied sich diese erkrankende Gruppe von der geschützten, mit Ovalbumin vorbehandelten Gruppe, einzig in der Präsenz des Peptids Ovalbumin während der Vorbehandlungsphase. In dessen Anwesenheit wurden die Tiere geschützt, fehlte es, so ging auch der schützende Effekt der Vorbehandlung verloren.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine Modulation der Erkrankung möglich ist. Eine Vorbehandlung mit einem Proteinantigen induzierte einen wirksamen Schutz. Dieser verhinderte nach Krankheitsinduktion den Ausbruch der Epidermolysis bullosa acquisita. Der Schutz war nicht antigenspezifisch. Er konnte durch die Vorbehandlung mit Proteinantigenen wie Kollagen-Typ-VII, GST oder Ovalbumin erzielt werden.

3.2.2 IgG1-Antikörpertiter sind im Blut gesunder Tieren nicht erhöht

Die Autoantikörpertiter der verschiedenen Versuchsgruppen wurden als AUC aufgetragen und verglichen. Die Kinetik der Autoantikörper im Blut ist dem Anhang zu entnehmen (**Abb. A–6**). Bei Versuchstieren ohne Vorbehandlung (PBS-Gruppe) waren hohe Titer sowohl der nicht komplementbindenden (IgG1) als auch der komplementbindenden Autoantikörper (IgG2b und IgG2c) im Plasma nachzuweisen (**Abb. 3–22**). Keine der vor der Krankheitsinduktion geschützten Versuchsgruppen zeigte erhöhte Autoantikörperspiegel der IgG1-Subklasse. Tatsächlich war sogar eine Reduktion der schützenden, nicht komplementbindenden IgG1-Autoantikörper nach Vorbehandlung mit Kollagen-Typ-VII sowie mit Ovalbumin zu beobachten. Die komplementbindenden Autoantikörper wiesen zwischen der erkrankenden PBS-Kontrollgruppe und den geschützten Versuchsgruppen (Kollagen-Typ-VII, GST und Ovalbumin) keine signifikanten Unterschiede auf. Jedoch waren die Titer für die komplementbindenden IgG2b- und IgG2c-Autoantikörper nach Vorbehandlung mit Kollagen-Typ-VII sowie GST tendenziell leicht reduziert (**Abb. 3–22**).

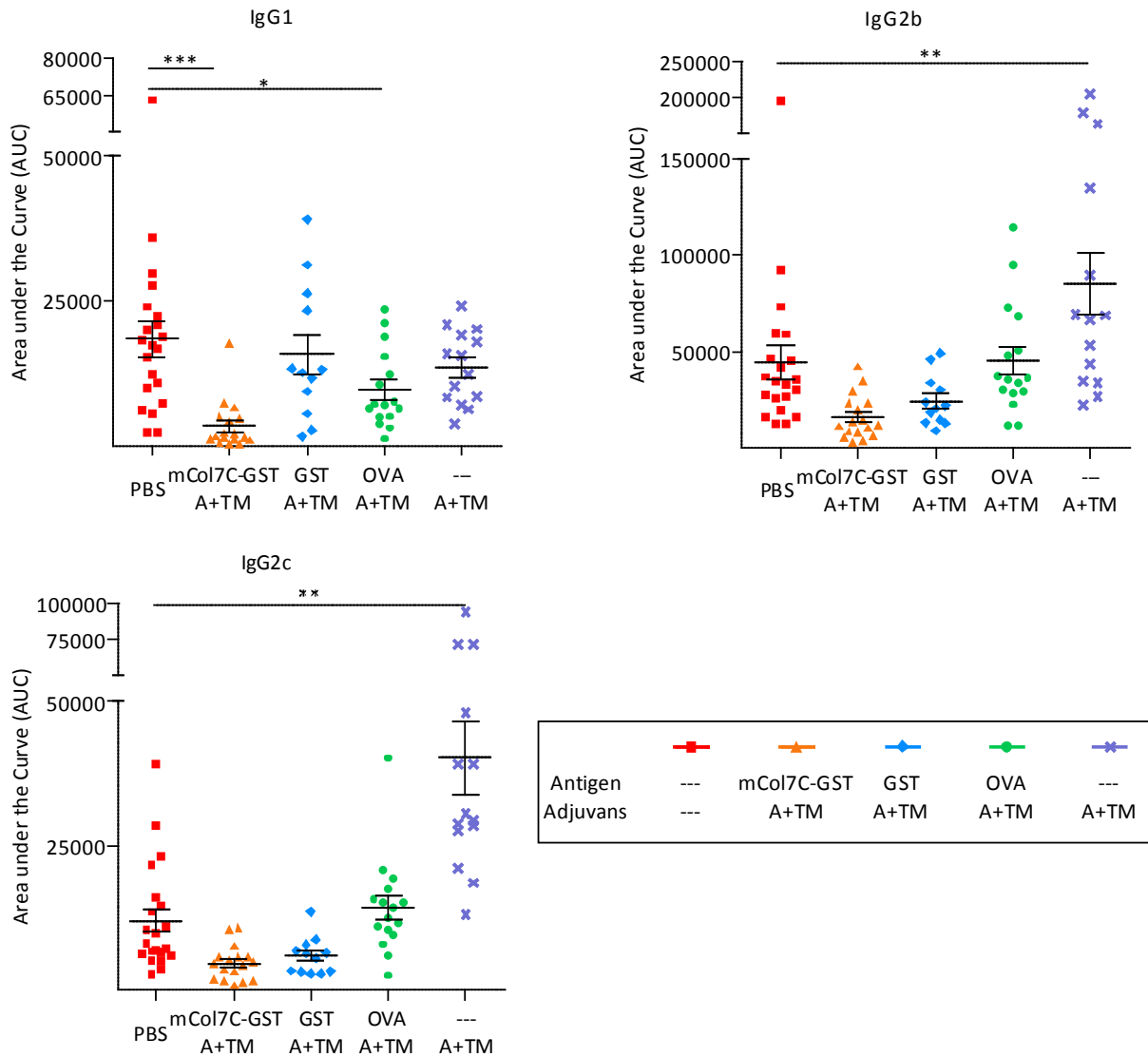


Abb. 3–22: Die zirkulierenden Antikörper korrelieren nicht mit dem Krankheitsverlauf. Mit einem Kollagen-Typ-VII-spezifischen ELISA wurden die IgG-Subklassen im Plasma quantifiziert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Ergebnisse aller Versuche zusammengefasst und als *Area under the Curve* dargestellt. PBS-Gruppe [3]: n = 21, mCol7C-GST-Gruppe [2]: n = 18, GST-Gruppe [2]: n = 13, OVA-Gruppe [2]: n = 16, A+TM-Gruppe [2]: n = 14. Die []-Klammern geben die Anzahl der Experimente an. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleich mittels 1-way ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test, *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. A: Aluminiumhydroxid, mCol7C: murines Kollagen-Typ-VII, GST: Glutathion-S-Transferase, OVA: Ovalbumin, TM: Titermax.

Die erkrankende, nur mit Adjuvantien behandelte Gruppe zeigte eine signifikante Erhöhung der pathogenen IgG2b- und IgG2c-Autoantikörper (**Abb. 3–22**). In allen untersuchten Versuchstieren waren, unabhängig von ihrem Krankheitsverlauf, Autoantikörper der verschiedenen IgG-Subklassen nachzuweisen. Eine Spearman-Korrelationsanalyse zwischen der AUC des Krankheitsverlaufs und der AUC der verschiedenen Subklassen im Blut lieferte keinen Zusammenhang. Weder war in geschützten

Tieren der IgG1-Titer erhöht, noch korrelierte die Menge der komplementbindenden Autoantikörper mit der Pathogenese der erkrankten Tiere.

3.2.3 Vergleichbare Autoantikörper- und Komplementbindung an dermo-epidermaler Junktionszone

Da die Menge der zirkulierenden Autoantikörper im Blut nicht mit dem Krankheitsverlauf korrelierte und die Epidermolysis bullosa acquisita eine Autoimmunerkrankung der Haut ist, wurde die Ablagerung der Autoantikörper an ihr Zielantigen in der dermo-epidermalen Junktionszone und die Komplementbindung untersucht. Die Quantifizierung der Ablagerung der Autoantikörper an die dermo-epidermale Junktionszone sowie die Bindung des Komplementfaktors C3 konnte jedoch keine signifikanten Unterschiede aufzeigen. Unabhängig von der Vorbehandlung waren vergleichbare Mengen an Autoantikörpern an die dermo-epidermale Junktionszone gebunden. Die induzierten Autoantikörper waren in der Lage, das Kollagen-Typ-VII in der Haut zu erkennen und zu binden. Es war auch kein Unterschied in der Aktivierung des Komplementfaktors C3 zu finden (**Abb. 3–23**).

ERGEBNISSE

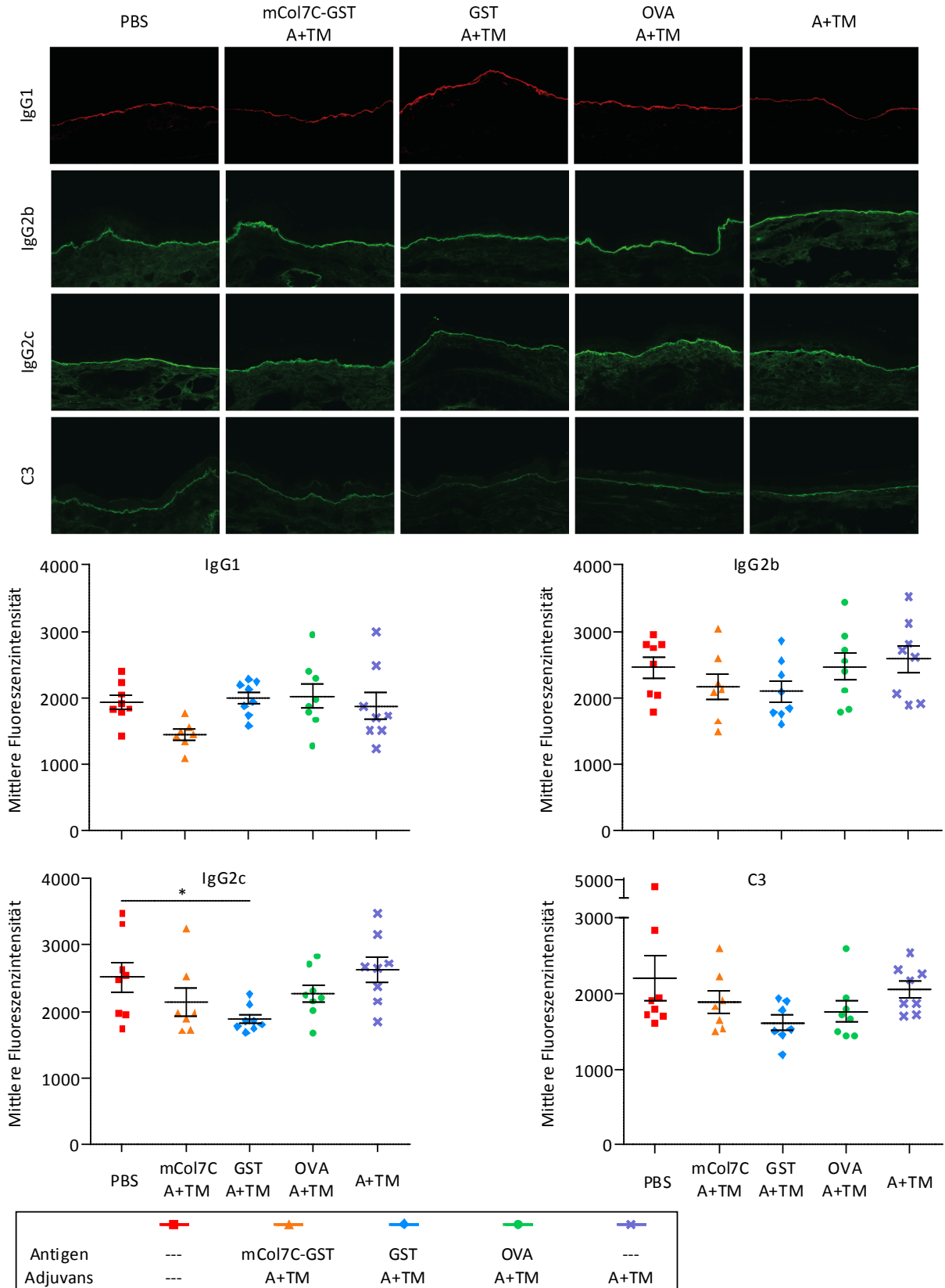


Abb. 3–23: Kein Unterschied in der Ablagerung von IgGs und C3 an die dermo-epidermale Junktionszone. Gesunde Areale der Ohrhaut (Woche 13 nach Krankheitsinduktion) wurden mit Hilfe der direkten Immunfluoreszenz analysiert. Anschließend wurde die Intensität der Ablagerung im Bereich der dermo-epidermalen Junktionszone mittels digitaler Bildanalyse (Photoshoperweiterung Fovea Pro 4.0) bestimmt. n = 8. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleich mittels 1-way ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test, *p < 0,05. A: Aluminiumhydroxid, mCol7C: murines Kollagen-Typ-VII, GST: Glutathion-S-Transferase, OVA: Ovalbumin, TM: Titermax.

3.2.4 Keine Veränderung der Autoantikörper Fc-Sialylierung durch schützende Vorbehandlung

Die Funktion und Wirkung von Immunglobulinen wird wesentlich durch ihre Fc-Glykosylierung reguliert. Ihre pro- oder antiinflammatorische Wirkung ist eng mit der endständigen Sialylierung des Polysaccharides des Fc-Fragments an Position Asparagin 297 verknüpft. Sialylierte Immunglobuline haben einen antiinflammatorischen Effekt. Mit sinkendem Sialylierungsanteil nimmt die inflammatorische Wirkung der Antikörper zu (Anthony et al., 2008b). Massenspektrometrisch wurden die Polysaccharide der Antikörper analysiert. Dadurch konnte der Anteil der verschiedenen Polysaccharide an den gesamten Glykanen bestimmt werden, die mindestens eine Sialinsäure trugen. Verglichen wurde die Sialylierung innerhalb jeder Gruppe zwischen den unspezifischen Antikörpern der Totalfraktion (Total) und den Kollagen-Typ-VII-bindenden Autoantikörpern der spezifischen Fraktion (Spez.).

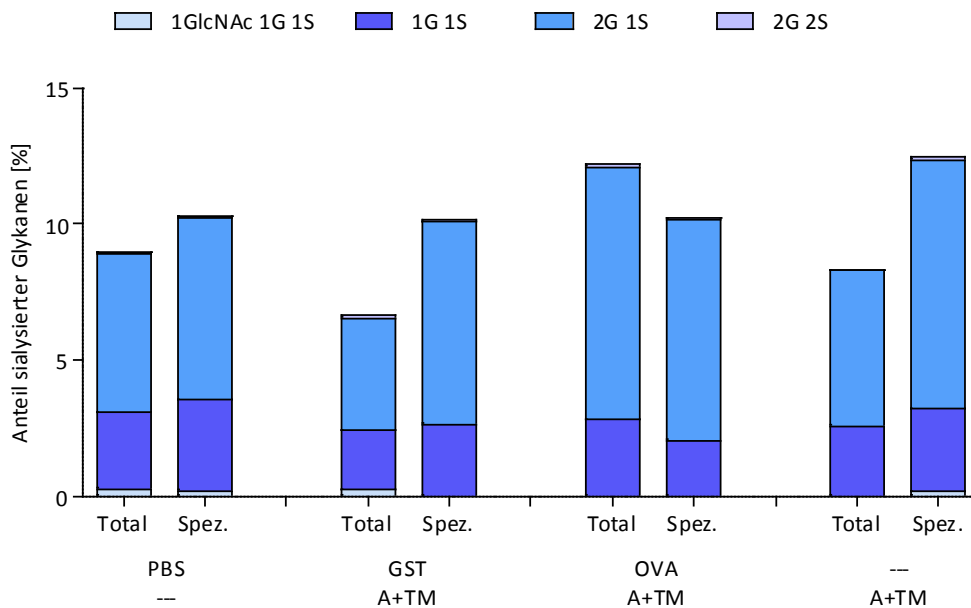


Abb. 3-24: Die IgG Fc-Sialylierung korrelierte nicht mit dem EBA-Phänotyp. Massenspektrometrisch untersucht wurden die Gesamtantikörper (Total) sowie die Kollagen-Typ-VII-spezifischen Autoantikörper (Spez.). Dazu wurde zunächst das Plasma einer jeden Versuchsgruppe aus Woche 13 nach Krankheitsinduktion vereinigt. Mittels einer Protein-G-Säule wurden die gesamten IgGs isoliert. Über eine Kollagen-Typ-VII-Säule konnten anschließend die spezifischen Antikörper angereichert werden. Die Polysaccharide wurden durch Endoglycosidase-S-Behandlung abgespalten und im Massenspektrometer untersucht. Aufgetragen wurden alle Zuckerreste, die mindestens eine Sialinsäure trugen. A: Aluminiumhydroxid, GST: Glutathion-S-Transferase, OVA: Ovalbumin, TM: Titermax, G: Galaktose, GlcNAc: N-Acetylglucosamin; S: Sialinsäure.

Es konnten in den verschiedenen Versuchsgruppen leichte Schwankungen zwischen den gesamten Immunglobulinen (Total) und den spezifischen Autoantikörpern (Spez) beobachtet werden. Entgegen den Erwartungen war der Anteil sialylierter Zucker in den erkrankenden Gruppen nicht reduziert noch führte eine schützende Vorbehandlung zu einer erhöhten Fc-Sialylierung der spezifischen Autoantikörper. Die Fc-Sialylierung der Kollagen-Typ-VII-spezifischen Autoantikörper lag bei den verschiedenen Versuchsgruppen auf vergleichbarem Niveau (**Abb. 3–24**).

Es konnte gezeigt werden, dass 13 Wochen nach Vorbehandlung keine Veränderung der Fc-Glykosylierung der Autoantikörper zwischen den erkrankten und geschützten Gruppen beobachtet werden konnte. So konnte vom Anteil sialylierter Immunglobuline nicht auf den Krankheitsverlauf geschlossen werden.

3.2.5 Vorbehandlung mit Ovalbumin induzierte im Lymphknoten ein T_H2-Milieu

Die zirkulierenden Autoantikörper im Blut korrelierten nicht mit dem Krankheitsverlauf. Auch die Ablagerung an der dermo-epidermale Junktionszone, dem lokalen Ort der Krankheit, führte zu keinem quantitativen Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen. Genauso waren die Daten zur Glykosylierung der Autoantikörper nicht mit dem Krankheitsverlauf in Einklang zu bringen.

Da die Ergebnisse der Untersuchungen der Autoantikörper nicht den schützenden Effekt der Vorbehandlung erklären konnten, wurde der Entstehungsort der Autoantikörper und die T-Zellhilfe im drainierenden Lymphknoten betrachtet. Durch die Vorbehandlung sollte dort ein T_H2-Milieu mit einer vermehrten IgG1-Autoantikörperproduktion induziert werden. Dazu wurden die erkrankende mit Aluminiumhydroxid und Titermax behandelte Gruppe mit der geschützten mit Ovalbumin in Aluminiumhydroxid und Titermax vorbehandelten Gruppe näher betrachtet. In der Vorbehandlung unterschieden sich diese beiden Gruppen einzig in der Präsenz von Ovalbumin. Fehlte es in der Behandlungsphase, so entwickelten die immunisierten Versuchstiere den fürs Tiermodell typischen Phänotyp der Epidermolysis bullosa acquisita. War es vorhanden, so blieb eine anschließende Krankheitsinduktion ohne Erfolg (**Abb. 3–21**).

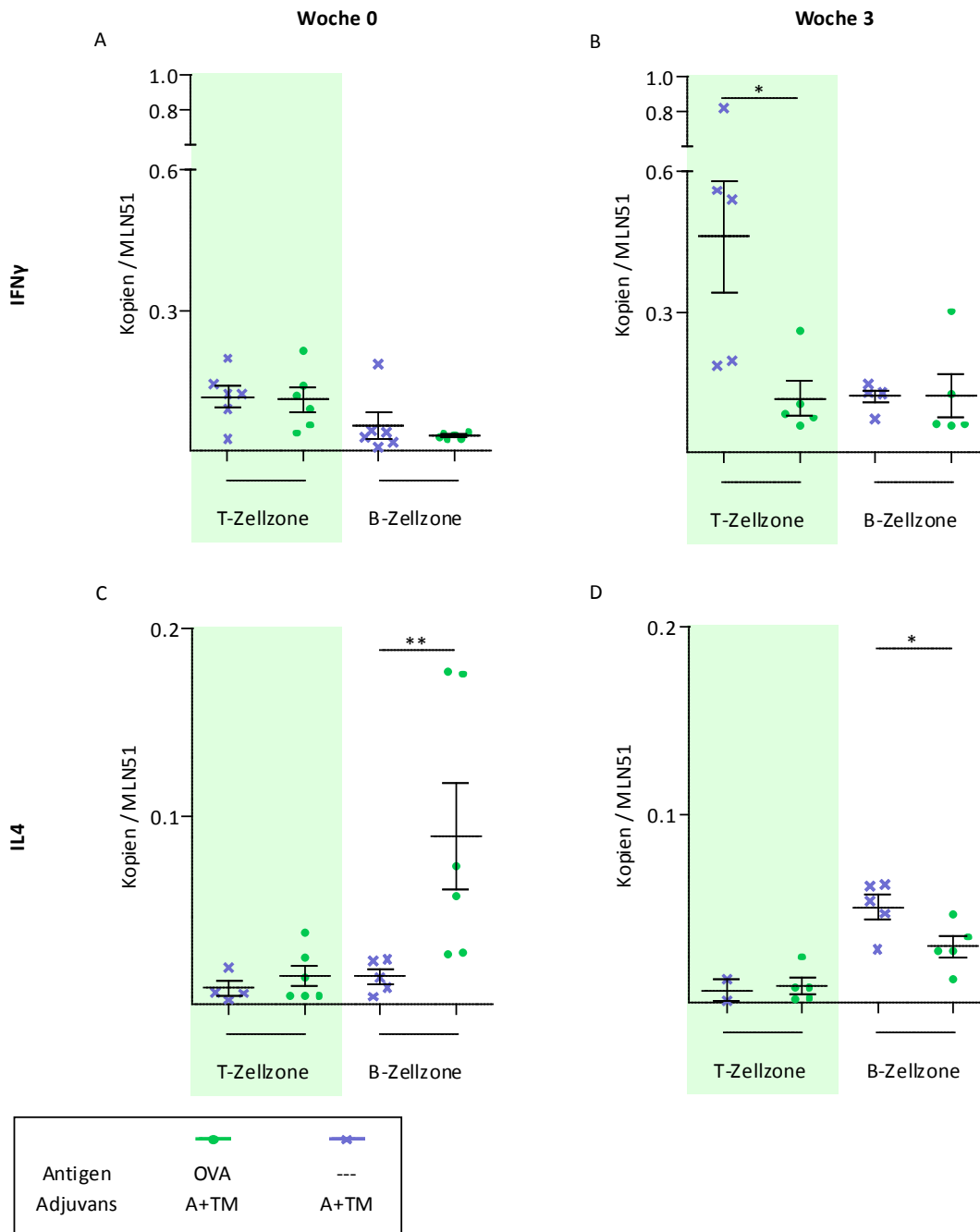


Abb. 3-25: Durch die Ovalbuminvorbehandlung wird IL4 hochreguliert, aber IFN γ herunter reguliert. Versuchstiere wurden mit Aluminiumhydroxid und Titermax ohne Antigen sowie mit Ovalbumin in Aluminiumhydroxid und Titermax vorbehandelt. Die Lymphknoten wurden nach der Vorbehandlung (Woche 0) sowie drei Wochen nach Krankheitsinduktion entnommen. Mittels der Lasermikrodissektion wurden T- und B-Zellzonen unabhängig voneinander isoliert. Das Expressionsniveau von IFN γ (A+B) und IL4 (C+D) wurde als Kopie pro Kopie von MLN51 (housekeeping gene) mittels quantitativer *real-time* RT-PCR bestimmt. Woche 0: n = 6, Woche 3: n = 5. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test, *p < 0,05; **p < 0,01. A: Aluminiumhydroxid, OVA: Ovalbumin, TM: Titermax.

Nach der Vorbehandlung in Woche 0 gab es zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede in der Expression des T_H1-Zytokins IFN γ . Die unterschiedliche Vorbehandlung hatte keine Auswirkung auf die IFN γ -Expression (**Abb. 3-25 A**). Drei Wochen nach

Krankheitsinduktion zeigten Versuchstiere der nur mit Adjuvantien behandelten Gruppe (nicht schützende Vorbehandlung) eine erhöhte Expression des proinflammatorischen Zytokins IFN γ in der T-Zellzone. Dieser IFN γ -Anstieg wurde in der mit Ovalbumin behandelten Gruppe nicht festgestellt (**Abb. 3–25 B**).

In drainierenden Lymphknoten der nur mit Adjuvantien vorbehandelten Tiere waren in Woche 0 keine Veränderungen in der Expression des T_H2-Zytokins IL4 festzustellen. Wurden die Tiere hingegen zusätzlich mit Ovalbumin vorbehandelt, konnte in Woche 0 eine signifikant erhöhte Expression von IL4 in der B-Zellzone bestimmt werden (**Abb. 3–25 C**). Drei Wochen nach Krankheitsinduktion stieg auch in der erkrankenden Gruppe die IL4-Expression in der B-Zellzone an, während in der Ovalbumin-Gruppe der signifikante Anstieg von Woche 0 wieder verschwunden ist (**Abb. 3–25 D**).

3.2.6 Zusammenfassung der Modulation der Epidermolysis bullosa acquisita

Die Pathogenese der Epidermolysis bullosa acquisita wurde im Tiermodell erfolgreich moduliert. Entgegen der anfangs aufgestellten Hypothese zur Verdrängung der pathogenen komplementaktivierenden IgG2-Autoantikörper durch Autoantikörper der IgG1-Subklasse konnte durch die Vorbehandlung kein Isotypenwechsel induziert werden. Weder die schützenden Autoantikörper der IgG1-Subklasse waren im Blut oder in der Haut erhöht noch konnten in der Haut Veränderungen in der Ablagerung pathogener Autoantikörper (IgG2b und IgG2c) beobachtet werden. Des Weiteren war die schützende Vorbehandlung unspezifisch. Eine Behandlung mit den Proteinantigenen Kollagen-Typ-VII, GST und Ovalbumin in Aluminiumhydroxid und Titermax lieferte einen adäquaten Schutz vor dem Ausbruch der Krankheit nach Krankheitsinduktion.

Die Zytokinanalyse im drainierenden Lymphknoten legte eine durch die schützende Vorbehandlung induzierte Modulation der T-Zellhilfe Richtung T_H2-Typ offen. Neben den Autoantikörpern spielt die Polarisation der T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Epidermolysis bullosa acquisita.

4 DISKUSSION

4.1 Transfer *in vitro* aktivierter Lymphozyten induziert *in vivo* eine Keimzentrumsreaktion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals auch im Mausmodell gezeigt werden, dass polyklonal aktivierte T-Zellen die B-Zellen stimulieren und nach intravenösem Zelltransfer in naive Empfängertiere eine Keimzentrumsbildung induzieren können. Sowohl in BALB/c- als auch in C57BL/6-Mäusen wurde in der Milz an Tag sechs eine heftige Keimzentrumsreaktion beobachtet (**Abb. 3–3** und **Abb. 3–4**). Obwohl die *in vitro* Aktivierung der T-Zellen aus beiden Mausstämmen vergleichbar war, wurden nach Transfer der BALB/c-Lymphozyten signifikant mehr und größere Keimzentren induziert. Zwar überlebten die T-zellstimulierende Kultur tendenziell mehr B-Zellen aus dem BALB/c-Mausstamm, jedoch bestand keine Korrelation zwischen der Menge transferierter B-Zellen und den gebildeten Keimzentren (**Tab. 3–1** und **Abb. A–1**). Die stärkere Keimzentrumsbildung im BALB/c-Mausstamm könnte zu einem auf die effektive Hilfe durch eine größere Population von CD4⁺ T-Zellen erklärt werden. Die CD4⁺ T-Zellen waren, verglichen mit den Lymphozyten der C57BL/6-Tiere, bei den BALB/c-Lymphozyten signifikant häufiger vertreten. Bei den C57BL/6-Lymphozyten überwogen nach stimulierender Kultur hingegen die CD8⁺ T-Zellen (**Tab. 3–1**). Ein Kreuztransfer von Lymphozyten aus BALB/c-Tieren mit kongenem Haplotyp in C57BL/6-Mäuse könnte zeigen, ob der signifikante Unterschied durch einen intrinsischen Effekt der transferierten Zellen verursacht wird, oder ob die BALB/c-Mäuse generell in diesem Modell eine stärker ausgeprägte Immunantwort aufweisen (Bailey, 1975; Freedman and Lilly, 1975).

Der signifikante Unterschied in der Keimzentrumsbildung kann zum anderen aber auch auf den beiden Mausstämmen selbst beruhen. Zellen aus unterschiedlichen Mausstämmen können verschieden auf den gleichen Stimulus reagieren. So führt eine Stimulation von B-Zellen mit einem CD40-Antikörper und IL23 in beiden Mausstämmen zu verschiedenen Effekten. B-Zellen aus BALB/c-Tieren zeigen eine erhöhte Proliferation und eine normale Sterberate, während es bei C57BL/6-Lymphozyten zu keiner erhöhten Proliferation, sondern

zu einer erhöhten Sterberate der B-Zellen kommt (Jin et al., 2004). BALB/c-Tiere tendieren zu einer humoralen Immunantwort mit einer T_H2 -Typ Polarisation, während C57BL/6-Tiere zu einer T_H1 -Reaktion neigen (Heinzel et al., 1989; Barthelmann et al., 2012). T_H1 -Zellen zeichnen sich durch eine IFN γ -Produktion aus und leiten eine zelluläre Immunantwort ein. T_H2 -Zellen hingegen produzieren vornehmlich IL4, IL5 und IL13 und sind in die humorale Immunantwort involviert (Zhou et al., 2009; Croxford and Buch, 2010). Um zu überprüfen, ob die starke Keimzentrumsbildung in BALB/c-Tieren auch zu einer starken humoralen Immunantwort führt, sollten in Folgeexperimenten in beiden Mausstämmen Veränderungen in den Antikörpertitern im Serum untersucht werden.

Die im Mausmodell induzierten Keimzentren waren mehrheitlich exogenen Ursprungs (**3.1.6.1**). Dies weist darauf hin, dass die Aktivierung der B-Zellen bereits in Kultur erfolgt. Ein Vergleich der Ergebnisse aus dem hier etablierten Mausmodell mit publizierten Daten des Rattenmodells zeigt, dass die Aktivierung der B-Zellen auch *in vivo* erfolgen kann (Nachbar, 2000). In beiden Tiermodellen werden Lymphozyten unter T-zellstimulierenden Bedingungen kultiviert (Bode et al., 1997; Baron et al., 2007). Im Rattenmodell sind nach drei Tagen Keimzentren überwiegend endogenen Ursprungs (80 %) zu beobachten, was eine Interaktion der *in vitro* stimulierten T-Zellen mit den endogenen B-Zellen des Empfängertieres impliziert (Nachbar, 2000). In der Maus konnte nach Transfer separierter und *in vitro* aktivierter $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen keine Keimzentrumsbildung beobachtet werden, unabhängig davon, ob die Separation der T-Zellen vor oder nach der Aktivierung erfolgte (**Abb. 3–13** und **Abb. A–3**). Im Mausmodell wurden die B-Zellen *in vitro* durch aktivierte T-Zellen stimuliert, Keimzentren zu bilden. Da jedoch in der Maus nach dem Transfer aktivierter Lymphozyten nicht 100 % der Keimzentren exogenen Ursprungs waren, ist auch hier eine *in vivo* Interaktion von transferierten Zellen und den B-Zellen des Empfängertieres möglich und für die endogen gebildeten Keimzentren verantwortlich. Somit ergänzen sich die beiden Modelle und zeigen, dass *in vitro* polyklonal aktivierte T-Zellen B-Zellen nach Transfer *in vivo* zu einer Keimzentrumsbildung stimulieren können.

4.2 T-Zellen stimulieren B-Zellen MHC-Klasse-II-unabhängig zur Keimzentrumsbildung und Produktion von Autoantikörpern

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der B-Zellen durch die polyklonal aktivierten T-Zellen unabhängig vom MHC-Klasse-II erfolgte. Die T-Zellen wurden

zwar über ihren T-Zellrezeptor und den Kofaktor CD28 aktiviert, konnten aber nach ihrer Aktivierung MHC-Klasse-II-unabhängig B-Zellen stimulieren. So waren T-Zellen mit massiv eingeschränktem T-Zellrezeptorreperoire aus DO11.10-Tieren uneingeschränkt in der Lage, B-Zellen zu stimulieren und Keimzentren zu induzieren (Abschnitt: **3.1.4**). Die Literatur beschreibt *in vitro* Ergebnisse, in denen polyklonal aktivierte T-Zellen, sowie die Plasmamembranen dieser T-Zellen, eine Aktivierung und Proliferation von B-Zellen induzieren können (Brian, 1988; Noelle et al., 1992). Auch hier erfolgt *in vitro* die Stimulation der B-Zellen durch die T-Zellen unabhängig von einer Antigenpräsentation über den MHC-Klasse-II-Komplex (Brian, 1988; Hodgkin et al., 1990; Brines and Klaus, 1993). Die Differenzierung der B-Zellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen, einschließlich eines Klassenwechsels von IgM zu IgG, IgA und IgE, kann *in vitro* durch Zugabe von Zellüberstand aktivierter T-Zellen oder der Zytokine IL4 und IL5 induziert werden (Hodgkin et al., 1990; Noelle et al., 1991). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die polyklonal aktivierten T-Zellen die B-Zellen nicht nur stimulieren, sondern *in vivo* eine Keimzentrumsreaktion induzieren können.

Die induzierte Keimzentrumsreaktion war von der T-Zellhilfe abhängig. Die Keimzentren zeichneten sich durch ihre Langlebigkeit und die Anwesenheit follikulärer T_H-Zellen innerhalb des Keimzentrums aus. Die induzierten Keimzentren blieben, verglichen mit der Kontrolle, über den gesamten Beobachtungszeitraum von 14 Tagen erhalten (**Abb. 3–5**). Im Gegensatz dazu brechen T-zellunabhängige Keimzentren nach fünf bis sechs Tagen durch Apoptose zusammen (Vinuesa et al., 2000). Die in diesem Modell induzierten Keimzentren wiesen eine vergleichbar hohe Anzahl follikulärer T_H-Zellen auf, wie sie in Keimzentren zu beobachten waren, von denen bekannt ist, dass diese T-zellabhängig sind (Kalies et al., 2008; Barthelmann et al., 2012). Diese follikulären T_H-Zellen leisten die T-Zellhilfe, die für die Bildung und Erhaltung der Keimzentren notwendig ist (Elgueta et al., 2009; Vitoria et al., 2010).

Die antigenunabhängige Stimulation von B-Zellen durch aktivierte T-Zellen birgt die Gefahr einer Autoimmunerkrankung. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der B-Zellen durch die polyklonal aktivierten T-Zellen zur Bildung von Autoantikörper führt (**Abb. 3–10**). In jedem gesunden Menschen können autoreaktive B-Zellen nachgewiesen werden (Koelsch et al., 2007; Meffre and Wardemann, 2008; Duty et al., 2009). Werden in Folge einer Infektion T-Zellen in hoher Zahl aktiviert, so können diese

darauhin in die Milz einwandern und durch eine Bystander-Aktivierung auch die autoreaktiven B-Zellen stimulieren. So ist ein Zusammenhang zwischen Autoimmunerkrankungen und Infektionen beschrieben (Bach, 2005; Kivity et al., 2009; Sfriso et al., 2010). Die polyklonal aktivierten T-Zellen vermitteln durch Zytokine und Kofaktoren Überlebens- und Differenzierungssignale auch an autoreaktive B-Zelle. Die auf diese Weise gesteigerte, positive Selektion von B-Zellen kann zu Autoimmunerkrankungen führen (Vinuesa et al., 2009). In der Literatur wird ein Zusammenhang zwischen spontaner Keimzentrumbildung, Bildung von Autoantikörpern und Autoimmunkrankheiten beschrieben (Luzina et al., 2001; Vinuesa et al., 2005a). Eine erhöhte Anzahl folliculäre T-Helferzellen kann zur Bildung spontaner Keimzentren und zur Entstehung eines zum systemischen Lupus erythematoses (SLE)-ähnlichen Phänotyps führen (Vinuesa et al., 2005a).

4.3 CD154 wird nicht bei der Aktivierung von B-Zellen benötigt, ist aber essentiell für die Keimzentrumbildung

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Stimulation der B-Zellen auch unabhängig von CD154. Für die erste Zell-Zellinteraktion zwischen T- und B-Zellen wurde das von den aktivierten T-Zellen exprimierte CD154 nicht benötigt. CD154-defiziente ebenso wie CD154-exprimierende T-Zellen waren gleichermaßen in der Lage, B-Zellen zu stimulieren und nach Transfer in einen CD154-kompetenten Hintergrund Keimzentren zu induzieren (**Abb. 3–11**). Die Irrelevanz von CD154 bei der *in vitro* Stimulation der B-Zellen wurde durch den Transfer dieser B-Zellen in den kongenen Ly5.1-Mausstamm belegt. Die gebildeten Keimzentren waren auf diejenigen B-Zellen zurückzuführen, die *in vitro* von CD154-defizienten T-Zellen stimuliert wurden (**Abb. 3–16**).

Diese Beobachtungen stehen scheinbar im Widerspruch mit der Literatur, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Bedeutung von CD154 bei der Interaktion zwischen T- und B-Zellen betont. So sind murine Erythroleukämie-(MEL)-Zellen, die mit CD154 transfiziert wurden, in der Lage, *in vitro* eine Proliferation naiver B-Zellen zu induzieren. Jedoch ist die Intensität der induzierten Proliferation in deutlichem Maße reduziert, wenn sie mit der B-Zellproliferation, die durch aktivierte T-Zellen erreicht werden kann, verglichen wird (Brines and Klaus, 1993). Des Weiteren kann eine B-Zellaktivierung und Proliferation mit einem monoklonalen, agonistischen anti-CD40 Antikörper induziert werden (Gordon et al.,

1988). So lassen sich monoklonale B-Zellen *in vitro* durch CD154 aktivieren und in Anwesenheit von IL4 und IL10 kann ein Klassenwechsel zu IgA, IgE und IgG stattfinden (Cerutti et al., 1998). Mit einem antagonistischen Antikörper kann die T-zellabhängige B-Zellaktivierung wiederum gehemmt werden (Noelle et al., 1992). Zwar können nach B-Zellaktivierung in Abwesenheit von CD154 und CD40 frühe Aktivierungsmarker wie *c-myc* RNA-Expression nachgewiesen werden, aber erfordert eine normale Aktivierung der B-Zelle den CD40-CD154-Signalweg (Liu et al., 1991; Schrader et al., 1997). Insgesamt kann *in vitro* durch die Stimulation des von den B-Zellen exprimierten CD40 eine Aktivierung der B-Zellen erreicht werden, jedoch bleibt die Aktivierung in ihrer Intensität stets unter dem Niveau, dass durch aktivierte T-Zellen erreicht werden kann.

Auch *in vivo* werden B-Zellen über den CD40-CD154-Signalweg stimuliert und treten in den Zellzyklus ein. Eine *in vivo* Blockade des Signalwegs mit einem anti-CD154-Antikörper unterdrückt die klonale Expansion von B-Zellen nach Immunisierung mit einem Antigen vollständig (Garside et al., 1998). Sowohl die primäre als auch die sekundäre Immunantwort wird durch den Einsatz des antagonistischen Antikörpers unterdrückt (Foy et al., 1993, 1994). Hier wird *in vivo* stets nur ein indirekter Nachweis für die Relevanz von CD154 bei der Aktivierung der B-Zellen erbracht. Negative Effekte, verursacht durch die Behandlung mit dem Antikörper, können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Obwohl die Behandlung nur vier Tage lang erfolgte, hielt die inhibierende Wirkung über drei Wochen an (Foy et al., 1993). Durch die anhaltende Präsenz des agonistischen CD154-Antikörpers kann nicht der genaue Zeitpunkt der inhibierenden Wirkung identifiziert werden.

Und genau hier liegt der scheinbare Widerspruch des Modells dieser Arbeit mit Ergebnissen der Literatur. Die Untersuchungen zur Relevanz von CD154 bei der Aktivierung von B-Zellen basieren meist auf *in vitro* Experimenten. Dabei bleibt die Übertragbarkeit auf die Situation *in vivo* fraglich. Bei der *in vivo* Anwendung von CD154-Antikörpern kann nicht strikt zwischen der Aktivierung der B-Zellen und der Keimzentrumbildung unterschieden werden, wenn als Messmethode die Antikörperproduktion dient. Der Vorteil des Tiermodells dieser Arbeit ist, dass zwischen der Aktivierung der B-Zellen und der Keimzentrumbildung unterschieden werden kann. Während hier CD154 für die Aktivierung der B-Zellen nicht erforderlich ist, ist die Keimzentrumbildung in hohem Maße von CD154-kompetenten T-Zellen abhängig. Denn obwohl für die Stimulation der B-Zellen durch die polyklonal aktivierten T-Zellen CD154 nicht erforderlich war, wurden Keimzentren nur nach Transfer in

Versuchstiere mit einem CD154-kompetenten Hintergrund gebildet. Erfolgte der Transfer in CD154-defiziente Tiere, so wurden keine Keimzentren gebildet (**Abb. 3–11** und **Abb. A–2**). Des Weiteren konnte hier gezeigt werden, dass die Aktivierung der B-Zelle sowie die T-Zellhilfe bei der Keimzentrumsreaktion nicht durch dieselbe T-Zelle erfolgt. B-Zellen, die durch CD154-kompetente T-Zellen aktiviert wurden, benötigen im Empfängertier T-Zellhilfe von CD154-kompetenten T-Zellen.

Es ist bekannt, dass CD154-defiziente Tiere nicht in der Lage sind, nach Immunisierung mit einem T-zellabhängigen Antigen, Keimzentren auszubilden. Im CD154-defizienten Mausstamm ist die primäre humorale Immunantwort (IgM-Produktion) gegen thymusabhängige Antigene reduziert, während die sekundäre humorale Immunantwort (IgG-Produktion) vollständig ausbleibt (Renshaw et al., 1994; Xu et al., 1994). Die Keimzentrumsbildung und der damit verbundene Klassenwechsel bei einer T-zellabhängigen Antikörperantwort ist in hohem Maße von CD154 und Zytokinen abhängig (Jabara et al., 1990; Defrance et al., 1992; Hasbold et al., 1999). Ohne diese Überlebenssignale sterben innerhalb von 18 Stunden nahezu alle B-Zellen des Keimzentrums durch Apoptose (Feuillard et al., 1995). Jedoch kann die Apoptose der Zentrozyten durch ein Kreuzvernetzung des B-Zellrezeptors sowie durch einen agonistischen monoklonalen CD40-Antikörper gehemmt werden (Liu et al., 1989).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass in den CD154-defizienten Tieren, die keine T-zellabhängigen Keimzentren bilden können, dennoch eine T-zellabhängige Keimzentrumsbildung induziert werden kann. Durch den Transfer ruhender CD154-kompetenter CD4⁺ T-Zellen konnten *in vivo* B-Zellen, die zuvor durch CD154-kompetente T-Zellen aktiviert wurden, in ihrer Keimzentrumsreaktion unterstützt werden. Innerhalb der gebildeten Keimzentren wurden einige ruhende CD154-kompetente CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen (**Abb. 3–17**). Aktivierte B-Zellen können in Abhängigkeit vom CD154-CD40-Signalweg naive T-Zellen aktivieren (Morris et al., 1994; Constant et al., 1995; Foy et al., 1996; Rodríguez-Pinto and Moreno, 2005). Auf diese Weise kann die B-Zelle die benötigte T-Zellhilfe induzieren.

4.3.1 Das neue Zweischnittmodell der Keimzentrumsbildung

Bisher wird angenommen, dass der erste Zell-Zellkontakt von T- und B-Zellen in der Grenzzone abhängig von CD154 ist. Nach diesem ersten Kontakt wandern die T- und B-Zellen

gemeinsam in den Follikel ein und bilden dort CD154-abhängig ein Keimzentrum (Vinuesa and Cyster, 2011). Die in der vorliegenden Arbeit induzierte Keimzentrationbildung kann mittels eines Zweischnittmodells erklärt werden. Im ersten Schritt werden B-Zellen durch aktivierte T-Zellen stimuliert. Diese B-Zellstimulation findet unabhängig einer Antigenpräsentation oder des Kofaktors CD154 statt. Um Keimzentren zu bilden, sind im zweiten Schritt die stimulierten B-Zellen auf CD154-kompetente T-Zellhilfe angewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die B-Zellen diese Hilfe im zweiten Schritt von ruhenden T-Zellen erhalten können, die nicht an der Stimulation der B-Zellen beteiligt waren.

Damit kann eine unkontrollierte Stimulation von B-Zellen zu einer Autoimmunerkrankung führen. In Form einer Bystander-Aktivierung können nach Infektion mit einem Pathogen im entzündlichen Milieu mit Gewebeschädigung antigenpräsentierende Zellen aktiviert werden. Folglich werden vermehrt körpereigener Strukturen prozessiert und präsentiert. Dadurch können wiederum autoreaktive T- oder B-Zellen aktiviert werden (Walker and Abbas, 2002). Stimulierte B-Zellen haben das Potential T-Zellen zu aktivieren und auf diese Weise ihre Differenzierung zu beeinflussen. Im Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) agieren aktivierte B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen und fördern eine proinflammatorische Polarisation der T-Zellen (Weber et al., 2010). Eine Depletion von B-Zellen, wie etwa bei der Behandlung der Autoimmunerkrankungen Lupus nephritis, Pemphigus vulgaris (PE) oder systemischer Lupus erythematodes (SLE), geht auch mit einer Reduktion der autoreaktiven T-Zellen sowie einer reduzierten T-Zellhilfe einher (Sfikakis et al., 2005; Eming et al., 2008; Lund and Randall, 2010). Zudem wird CD154 in membrangebundener und löslicher Form eine wichtige Rolle bei immunentzündlichen Prozessen von Autoimmunkrankheiten zugesprochen (Schönbeck and Libby, 2001; Hassan et al., 2009). Die CD154-Beteiligung wird auch für Autoimmunkrankheiten diskutiert, bei denen die Aktivierung von T- und B-Zellen von Bedeutung ist, wie zum Beispiel systemischer Lupus erythematodes, rheumatoide Arthritis (RA), Lupus nephritis, Multiple Sklerose und Typ-I-Diabetes (Gerritse et al., 1996; Alaaeddine et al., 2012). Es lassen sich erhöhte Level von löslichem CD154 im Blut von SLE- und RA-Patienten beobachten. Auch eine erhöhte Expression von CD154 auf T-Zellen kann detektiert werden (Koshy et al., 1996; Toubi and Shoenfeld, 2004). Eine Behandlung von SLE-Patienten mit einem anti-CD154-spezifischen Antikörper führt zur Minderung von Symptomen. Die Zahl der im peripheren Blut

zirkulierenden, aktivierten B-Zellen sowie die Autoantikörpertiter können durch diese Behandlung reduziert werden (Grammer et al., 2003).

Der Organismus ist daher auf strenge Kontrollmechanismen angewiesen, die eine unbeabsichtigte Aktivierung von T-Zellen verhindern sollen (Adelstein et al., 1991; Rioux and Abbas, 2005).

4.4 Modulierende Vorbehandlung schützt vor Epidermolysis bullosa acquisita ohne die schützenden IgG1-Autoantikörper zu erhöhen

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Modulation der Pathogenese der autoantikörpervermittelten Epidermolysis bullosa acquisita möglich ist. Durch eine Vorbehandlung mit einem Proteinantigen (Kollagen-Typ-VII, GST und Ovalbumin) in den Adjuvantien Aluminiumhydroxid und Titermax konnte antigenunabhängig ein schützender Effekt induziert werden, der den pathogenen Phänotyp nach Krankheitsinduktion bei den Versuchstieren verhinderte (siehe Abschnitt **3.2.1**). Ein signifikanter Schutz wurde auch erreicht, wenn in der Vorbehandlung mit Ovalbumin das Adjuvans Titermax substituiert wurde (**Abb. A-4** und **Abb. A-5**). Die modulierende Vorbehandlung in diesem Modell schützte zwar vor dem pathogenen Krankheitsverlauf, jedoch nahm sie kaum einen Einfluss auf die Quantität und Qualität der IgG-Subklassen. Von den untersuchten Subklassen ist bekannt, dass in der Maus IgG1 nicht die Komplementkaskade induziert, während IgG2b und IgG2c komplementaktivierende Antikörper sind (Ey et al., 1978; Klaus et al., 1979; Uysal et al., 2009; Daha et al., 2011). Entgegen unserer Hypothese wurde im Blut der geschützten Gruppen (Vorbehandlung mit Kollagen-Typ-VII, GST und Ovalbumin) weder ein Anstieg schützender, nicht komplementaktivierender Autoantikörper der IgG1-Subklasse noch eine signifikante Reduktion der pathogenen Autoantikörper der IgG2b- und IgG2c-Subklasse beobachtet (**Abb. 3-22**). Eine Immunisierung mit einem Proteinantigen in dem Adjuvans Aluminiumhydroxid induziert eine vermehrte Produktion von IgG1-Antikörpern (Hunter, 2002; Cribbs et al., 2003). Jedoch konnte im Mausmodell der Epidermolysis bullosa acquisita gezeigt werden, dass die zirkulierenden Autoantikörper in dem EBA-empfindlichen SJL-Mausstamm und dem resistenten BALB/c-Mausstamm nicht mit dem Krankheitsverlauf korrelieren. Geschützte Versuchstiere weisen vergleichbare Titer der Autoantikörper im Blut

auf (Hammers et al., 2011). Dies könnte darauf schließen lassen, dass durch die Vorbehandlung nicht die Menge der zirkulierenden Autoantikörper beeinflusst wurde, sondern vielmehr ihre Spezifität oder ihre Funktion.

Eine durch die Vorbehandlung induzierte Modulation der Spezifität der Autoantikörper für ihr Zielantigen in der Haut kann ausgeschlossen werden. Trotz verschiedenen Phänotyps unterschieden sich die induzierten Autoantikörper nicht in ihrer quantitativen Bindung an die Haut (**Abb. 3–23**). Im EBA-empfindlichen SJL-Mausstamm werden durch die Autoantikörper bestimmte Epitope in der Haut gebunden, wodurch auch das Komplement aktiviert wird. In EBA-resistenten Tieren werden hingegen andere Epitope erkannt. Zwar kann dann auch eine Bindung der Autoantikörper an die Haut nachgewiesen werden, jedoch wird die Komplementkaskade nicht aktiviert und der pathogene Phänotyp bleibt aus (Ludwig et al., 2010). Da jedoch in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede in der Komplementbindung, gemessen an der Ablagerung des Komplementfaktors C3 an die dermo-epidermale Junktionszone, festgestellt wurden, kann eine Modulation der Epitopenbindung ausgeschlossen werden. Trotz verschiedenen Phänotyps konnten die Autoantikörper an die Haut binden und die Komplementkaskade aktivieren.

In der Literatur beschrieben sind Unterschiede in der Ablagerung von Autoantikörpern an die dermo-epidermale Junktionszone. Während in EBA-anfälligen Mausstämmen eine intensive Bindung von komplementbindenden Autoantikörpern nachgewiesen werden kann, zeichnen sich EBA-resistente Mausstämme wie etwa BALB/c oder C57BL/6 durch eine vermehrte Ablagerung nicht komplementbindender Autoantikörper der IgG1-Subklasse aus (Ludwig et al., 2010; Hammers et al., 2011). Auch ein Vergleich der Autoantikörperablagerung an die Haut kranker und gesunder Tiere innerhalb des SJL-Mausstamms führt zu ähnlichen Ergebnissen (Ellebrecht, 2012). In diesen Arbeiten werden jedoch kranke Hautareale mit gesunden Hautarealen verglichen. Um im Modell der vorliegenden Arbeit eine Vergleichbarkeit zwischen den Versuchsgruppen zu gewährleisten, wurden stets gesunde Hautareale untersucht, unabhängig vom Krankheitsverlauf. Daher ist kein direkter Bezug zu den oben genannten Arbeiten möglich. Dies kann erklären, warum in der Literatur zwischen erkrankenden und gesunden Tieren Unterschiede in der Ablagerung von Autoantikörpern an die Haut und der Komplementaktivierung detektiert werden, diese jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden können.

4.5 Induzierter Schutz korreliert nicht mit der Fc-Sialylierung der Autoantikörper

In der vorliegenden Arbeit konnten nach verschiedener Vorbehandlung keine Unterschiede in der Fc-Sialylierung der Kollagen-Typ-VII-spezifischen Autoantikörper gemessen werden. Da jedoch die Daten momentan auf nur einem Messergebnis je Gruppe beruhen, ist eine Deutung der Ergebnisse schwierig und muss noch durch Folgeexperimente bestätigt werden (**Abb. 3–24**). Für die Gewinnung und die Analyse der Kollagen-Typ-VII-spezifischen Autoantikörper musste das Plasma aller Versuchstiere einer jeden Gruppe vereinigt werden. Dadurch können in einem *in vivo* Modell Informationen verloren gehen. Abweichungen eines einzelnen Tieres können das Ergebnis der gesamten Gruppe unbemerkt beeinflussen. Eine pro- oder antiinflammatorische Wirkung von Antikörpern wird wesentlich durch ihre Glykosylierung am Fc-Fragment reguliert (Kaneko et al., 2006; Anthony et al., 2008a; Nimmerjahn and Ravetch, 2008). Die Modifikation der Zuckerszusammensetzung wirkt sich gravierend auf die Funktionalität der Antikörper aus. Antikörper ohne endständige Sialinsäuren vermitteln einen proinflammatorischen Effekt, während sialylierte Antikörper antiinflammatorisch wirken (Parekh et al., 1985; Anthony et al., 2008b, 2011). Daher wurde bei dem durch die Vorbehandlung induzierten Schutz eine erhöhte Sialylierung der Autoantikörper erwartet. Die erhöhte Sialylierung konnte nicht für die schützende GST- oder Ovalbumin-Vorbehandlung beobachtet werden (**Abb. 3–24**). Hoch-sialylierte Antikörper vermitteln einen antiinflammatorischen Effekt. Intravenös verabreichte Immunglobuline (IVIG) werden in hohen Dosen (2 g/kg) zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt (Nimmerjahn and Ravetch, 2008). Zwar ist der genaue Wirkmechanismus noch nicht aufgedeckt, aber es konnte gezeigt werden, dass die Effizienz einer IVIG-Behandlung durch eine Erhöhung des Anteils sialylierter Antikörper verbessert wird (Kaneko et al., 2006).

In einem Folgeexperiment sollte die Glykosylierung in einzelnen Tieren bestimmt werden. Erst durch diese zusätzlichen Untersuchungen kann über den Einfluss der Vorbehandlung auf die Glykosylierung der Autoantikörper entschieden werden. Auch sollte in diesem Zusammenhang zusätzlich eine mögliche Veränderung der α -2,6-Sialyltransferase in den Plasmazellen analysiert werden. Die Sialylierung von Antikörpern hängt vom Milieu ab, in dem die Plasmazellen entstehen. Erfolgt eine Antigenstimulation unter inflammatorischen Bedingungen, so wird in den Plasmazellen die α -2,6-Sialyltransferase

herunterreguliert. Dadurch werden die Antikörper weniger sialyliert und wirken proinflammatorisch. Fehlt jedoch das proinflammatorische Signal in der Bildungsphase, so entstehen Plasmazellen mit hoher Expression der α -2,6-Sialyltransferase. Gebildet werden anschließend Antikörper mit antiinflammatorischer Wirkung (Oefner et al., 2012). Interessant wäre in diesem Rahmen auch die Untersuchung der Expression von SIGN-R1 (specific ICAM-3 grabbing non-integrin-related 1). SIGN-R1 wird für die antiinflammatorische Wirkung von IVIG benötigt, indem es an das sialylierte Fc-Fragment von Immunglobulinen bindet (Anthony et al., 2008b). Der durch die Vorbehandlung induzierte Schutz kann mit einer erhöhten Expression des Rezeptors korrelieren, wodurch der antiinflammatorische Effekt der sialinsäuretragenden Antikörper verstärkt wird.

4.6 Vorbehandlung induziert unterschiedliche T-Helferzellen

Die Vorbehandlung der Versuchstiere mit einem Proteinantigen in Aluminiumhydroxid und Titermax induzierte einen Schutz vor dem pathogenen Verlauf der Epidermolysis bullosa acquisita, jedoch kann dieser Schutz nicht durch Modulation der Autoantikörper in Quantität oder Qualität erklärt werden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die T-Zellantwort im drainierenden Lymphknoten untersucht.

Die nicht schützende Vorbehandlung mit den Adjuvantien Aluminiumhydroxid und Titermax hatte zur Folge, dass drei Wochen nach Krankheitsinduktion vermehrt IFN γ exprimiert wurde, was zur Pathogenese der Epidermolysis bullosa acquisita führte. Durch die Vorbehandlung mit Ovalbumin in Aluminiumhydroxid und Titermax wurde hingegen eine erhöhte Expression von IL4 in der B-Zellzone des drainierenden Lymphknotens induziert. Diese T_H2-Typ polarisierten T-Zellen inhibierten nach Krankheitsinduktion die IFN γ -Expression in der T-Zellzone (**Abb. 3–25**). Unabhängig von der Lokalisation einer Zytokinausschüttung erhält die Mehrzahl der Lymphozyten eines drainierenden Lymphknotens (einschließlich naiver T-Zellen) das Zytokinsignal. Diese Zellen ändern daraufhin ihren Phänotyp beziehungsweise die damit verbundene Funktionsrichtung. So wird auch durch eine T_H2-Polarisation des drainierenden Lymphknotens mit IL4-Ausschüttung (entspricht der Vorbehandlung im Modell dieser Arbeit), eine sich anschließende T_H1-Reaktion mit IFN γ -Produktion (entspricht der Krankheitsinduktion) gegen ein anderes Antigen unterdrückt (Perona-Wright et al., 2010).

Anhand der Daten der vorliegenden Arbeit kann für die Pathogenese und den Mechanismus der Vorbehandlung eine neue Signalkaskade definiert werden (**Abb. 4–1**). Ohne schützende Vorbehandlung werden nach Krankheitsinduktion Kollagen-Typ-VII-spezifische T_H1 -Zellen gebildet. T-zellvermittelt werden Autoantikörper induziert, die sich an die dermo-epidermale Junctionszone der Haut lagern und die Komplementkaskade aktivieren. Die T_H1 -Zellen wandern in die Haut ein, wo sie erneut auf ihr Antigen treffen. Dadurch aktiviert, schütten sie proinflammatorische Zytokine wie IFN γ aus (Austin et al., 1999; Robert and Kupper, 1999; Lew et al., 2004). Weitere Immunzellen wie die neutrophilen Granulozyten werden angezogen. Auf diese Weise unterstützen die T-Zellen die Autoimmunreaktion in der Haut und induzieren den pathogenen Phänotyp der Epidermolysis bullosa acquisita (**Abb. 4–1**). Damit sind die T-Zellen für die Bildung der Autoantikörper aber auch für die Induktion der Krankheit in der Haut notwendig.

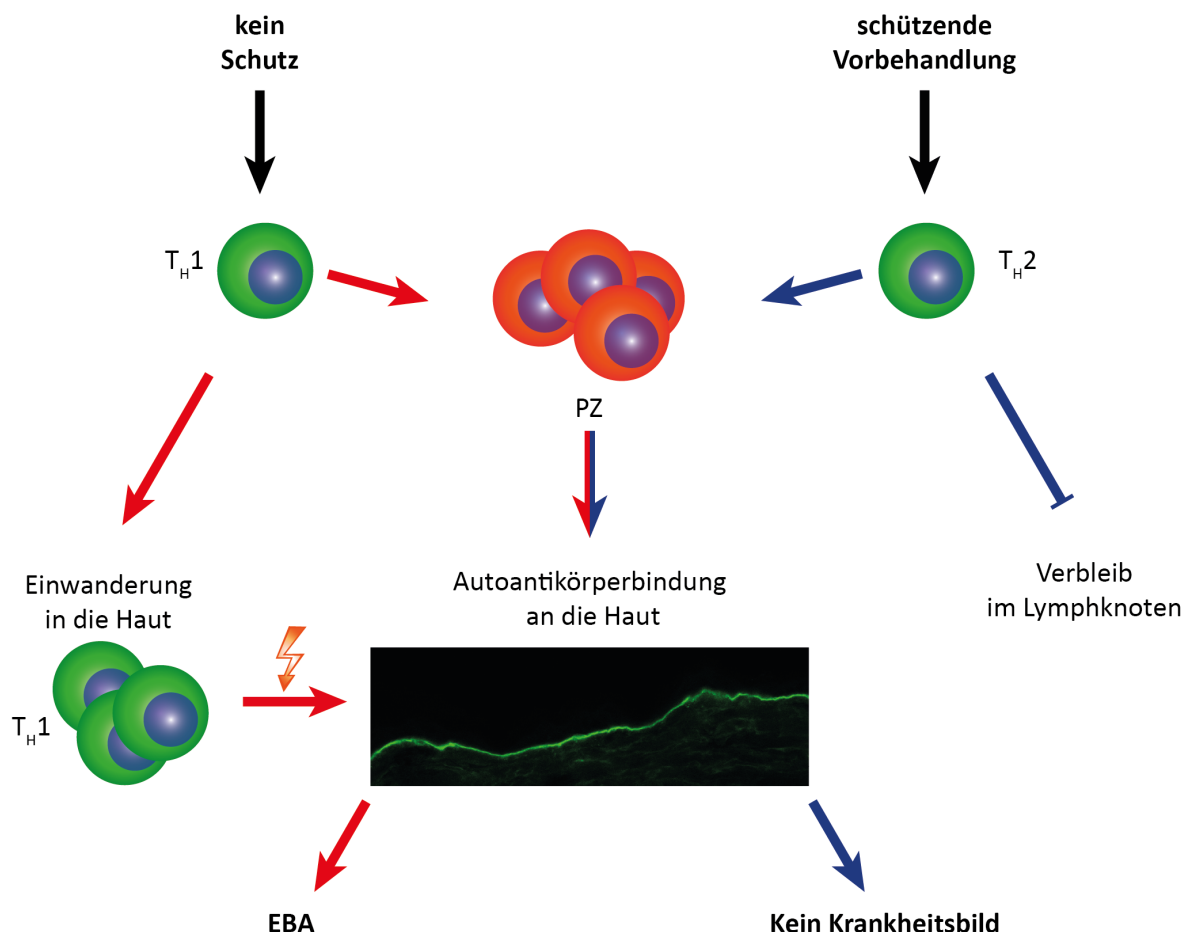


Abb. 4–1: T-Zellhilfe in der Haut induziert Epidermolysis bullosa acquisita. Nach Krankheitsinduktion unterstützen T_H1 -Typ Zellen (roter Signalweg; ohne schützende Vorbehandlung) genau wie T_H2 -Typ Zellen (blauer Signalweg; schützende Vorbehandlung mit Proteinantigen) die Plasmazellen in der Produktion von Autoantikörpern. T_H1 -Typ Zellen wandern in die Haut ein, wo sie IFN γ ausschütten, neutrophile Granulozyten anlocken und die Epidermolysis bullosa acquisita induzieren. Die T_H2 -Typ Zellen verbleiben im Lymphknoten und können in der Haut die Krankheit nicht induzieren. EBA: Epidermolysis bullosa acquisita, PZ: Plasmazellen.

Die Vorbehandlung mit einem Proteinantigen wie Ovalbumin und den Adjuvantien Aluminiumhydroxid und Titermax induzierte hingegen ein T_H2 -Milieu im drainierenden Lymphknoten. Durch diese Polarisierung wird die Bildung von IFN γ -sezernierenden, Kollagen-Typ-VII-spezifischen T-Zellen unterdrückt. Es entstehen hingegen Kollagen-Typ-VII-spezifische T_H2 -Typ Zellen. Diese unterstützen ebenfalls die Bildung von Autoantikörpern, die sich an die Haut lagern. T-Zellen des T_H2 -Typs wandern jedoch nicht in die Haut ein. Damit fehlen die T-Zellen in der Haut, um die Autoimmunreaktion zu induzieren, sodass die Tiere keine Epidermolysis bullosa acquisita entwickeln (**Abb. 4–1**). Im SRBC-Modell konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu Zellen des T_H1 -Typs, die T_H2 -Zellen nicht in die Haut einwandern können (Stamm, 2011). Für die Pathogenese der Epidermolysis bullosa acquisita sind jedoch die T-Zellen essenziell. SJL-Nacktmäuse, denen T-Zellen fehlen, sind resistent gegen eine Krankheitsinduktion und bilden keine Autoantikörper. Nach Transfer von T-Zellen von immunisierten SJL-Tieren in SJL-Nacktmäuse kann eine Produktion autoreaktiver Antikörper beobachtet werden (Sitaru et al., 2006, 2010).

Für eine effiziente Behandlung der Epidermolysis bullosa acquisita sollte der Fokus auf die T-Zellantwort gelegt werden. So verbessert die Behandlung von Versuchstieren mit Inhibitoren des Hitzeschockproteins 90 den klinischen Phänotyp der Epidermolysis bullosa acquisita. Durch diese Therapie wird nicht die Anzahl spezifischer Plasmazellen reduziert, sondern die Proliferation der T-Zellen enorm gehemmt (Kasperkiewicz et al., 2011). Ein weiterer möglicher Behandlungsansatz könnte der Einsatz des immunosuppressiv wirkenden Moleküls FTY720 (Fingolimod) sein. Es ist bekannt, dass FTY720 die Auswanderung der Lymphozyten aus dem Lymphknoten ins Blut und damit auch ins Gewebe inhibiert (Matloubian et al., 2004; Cyster, 2005). Dadurch könnte möglicherweise die Entstehung der Epidermolysis bullosa acquisita verhindert oder sogar behandelt werden.

Die Daten sowie die Literatur weisen auf die T-Zellen als therapeutisches Ziel hin, um in Zukunft Epidermolysis bullosa acquisita erfolgreich zu behandeln. Die vorliegenden Daten lassen einige Fragen offen: Kann die schützende Vorbehandlung, wie sie hier gezeigt wurde, in eine Behandlung der Epidermolysis bullosa acquisita umgewandelt werden? Kann die T_H1 -Typ Polarisierung im Lymphknoten erkrankter Tiere in eine T_H2 -Typ Immunreaktion umgekehrt werden? In Zukunft gilt es zu zeigen, dass die etablierte Immunreaktion durch eine schützende Behandlung moduliert werden kann. Essenziell ist auch der Anspruch an die

Spezifität der Behandlung. Um das gesamte Immunsystem nicht zu blockieren, sollten nur Kollagen-Typ-VII-spezifische T-Zellen beeinflusst werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit besteht aus zwei Teilen. Im ersten Teil wird die Entstehung von Autoantikörpern untersucht. Dazu werden T-Zellen *in vitro* polyklonal aktiviert, so dass sie B-Zellen stimulieren und nach Transfer in naive Tiere eine Keimzentrumsreaktion induzieren können. Polyklonal aktivierte T-Zellen können, unabhängig von einer MHC-Klasse-II-vermittelten Antigenpräsentation oder des Kofaktors CD154, B-Zellen stimulieren. Für die Keimzentrumsbildung wird hingegen CD154 als Kofaktor benötigt. Die in dieser Arbeit induzierten Keimzentren resultierten in einer Produktion von Autoantikörpern, die die Basis einer Autoimmunerkrankung bilden können. Da in jedem gesunden Menschen autoreaktive B-Zellen zirkulieren, birgt dies die Gefahr einer Autoimmunerkrankung. Werden in Folge einer Infektion T-Zellen in hoher Zahl aktiviert, so können diese daraufhin in die Milz einwandern und durch eine Bystander-Aktivierung auch die autoreaktiven B-Zellen stimulieren und damit eine Autoimmunreaktion induzieren.

Damit kann im vorliegenden Modell die Keimzentrumsbildung durch einen Zweischrittmechanismus beschrieben werden. Im ersten Schritt stimulieren polyklonal aktivierte T-Zellen unabhängig von MHC-Klasse-II und CD154 die autoreaktiven B-Zellen. Im zweiten Schritt aktivieren die stimulierten B-Zellen in Abhängigkeit vom CD154-CD40-Signalweg ruhende T-Zellen und induzieren damit die für die Keimzentrumsbildung notwendige T-Zellhilfe. Für die Aktivierung der B-Zelle und für die T-Zellhilfe bei der Keimzentrumsreaktion ist nicht ein und dieselbe T-Zelle verantwortlich.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wird versucht, den pathogenen Verlauf der autoantikörpervermittelten Autoimmunerkrankung Epidermolysis bullosa acquisita zu verhindern. Durch den Einsatz von Aluminiumhydroxid sollen vermehrt schützende IgG1-Autoantikörper gebildet werden, die die Komplementkaskade nicht aktivieren. Ihre Anlagerung an die Haut soll pathogene Autoantikörper verdrängen und somit die Pathogenese verhindern. Die durchgeführten Versuche zeigen, dass die Pathogenese der Epidermolysis bullosa acquisita im Tiermodell erfolgreich verhindert werden kann. Jedoch ist der induzierte Schutz unspezifisch, da auch eine Vorbehandlung mit Ovalbumin einen

Ausbruch der Krankheit verhindert. Trotz Schutzfunktion kann eine Modulation der Autoantikörper ausgeschlossen werden. Weder sind die schützenden IgG1-Autoantikörper im Blut oder an der Haut signifikant erhöht, noch führt die schützende Vorbehandlung zu einer signifikanten Reduktion der pathogenen Autoantikörper (IgG2b und IgG2c). Verglichen mit der erkrankten Kontrollgruppe weisen die vorbehandelten Tiere keinen Phänotyp der Epidermolysis bullosa acquisita auf, obwohl die Komplementkaskade in allen Gruppen in gleicher Weise aktiviert wird. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass durch die schützende Vorbehandlung im drainierenden Lymphknoten eine T_H2-Typ Polarisation induziert wird. Durch diese T_H2-Typ Polarisation des Milieus wird nach Krankheitsinduktion die Bildung von T_H1-Typ Kollagen-Typ-VII-spezifischen T-Zellen unterdrückt. Daher können auch keine T_H1-Zellen in die Haut einwandern und durch Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IFN γ neutrophile Granulozyten anlocken. Aufgrund der fehlenden T_H1-Zellen wird durch die Vorbehandlung der pathogene Verlauf der Epidermolysis bullosa acquisita verhindert.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass B-Zellen, die antigenunabhängig durch aktivierte T-Zellen stimuliert werden, Keimzentren bilden können, die in einer Autoimmunerkrankung resultieren. Durch eine gezielte Behandlung kann die T-Zellhilfe moduliert und so die Manifestation einer Autoimmunerkrankung verhindert werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adelstein, S., Pritchard-Briscoe, H., Anderson, T. A., Crosbie, J., Gammon, G., Loblay, R. H., Basten, A., and Goodnow, C. C. (1991). Induction of self-tolerance in T cells but not B cells of transgenic mice expressing little self antigen. *Science* *251*, 1223–1225.
- Alaaeddine, N., Hassan, G. S., Yacoub, D., and Mourad, W. (2012). CD154: an immunoinflammatory mediator in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Clinical & Developmental Immunology* *2012*, 490148.
- Allen, C. D. C., Ansel, K. M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., and Cyster, J. G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nature Immunology* *5*, 943–952.
- Allen, C. D. C., Okada, T., and Cyster, J. G. (2007). Germinal-Center Organization and Cellular Dynamics. *Immunity* *27*, 190–202.
- Anderson, S. M., Khalil, A., Uduman, M., Hershberg, U., Louzoun, Y., Haberman, A. M., Kleinstein, S. H., and Shlomchik, M. J. (2009). Taking advantage: high-affinity B cells in the germinal center have lower death rates, but similar rates of division, compared to low-affinity cells. *The Journal of Immunology* *183*, 7314–7325.
- Ansel, K. M., McHeyzer-Williams, L. J., Ngo, V. N., McHeyzer-Williams, M. G., and Cyster, J. G. (1999). In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *The Journal of Experimental Medicine* *190*, 1123–1134.
- Anthony, R. M., Kobayashi, T., Wermeling, F., and Ravetch, J. V (2011). Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature* *475*, 110–113.
- Anthony, R. M., Nimmerjahn, F., Ashline, D. J., Reinhold, V. N., Paulson, J. C., and Ravetch, J. V (2008a). Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science* *320*, 373–376.
- Anthony, R. M., Wermeling, F., Karlsson, M. C. I., and Ravetch, J. V (2008b). Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 19571–19578.
- Arbuckle, M. R., McClain, M. T., Rubertone, M. V, Scofield, R. H., Dennis, G. J., James, J. a, and Harley, J. B. (2003). Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *The New England Journal of Medicine* *349*, 1526–1533.

- Arora, K. P., Sachdeva, B., Singh, N., and Bhattacharya, S. N. (2005). Remission of recalcitrant epidermolysis bullosa acquisita (EBA) with colchicine monotherapy. *The Journal of Dermatology* 32, 114–119.
- Austin, L. M., Ozawa, M., Kikuchi, T., Walters, I. B., and Krueger, J. G. (1999). The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bi. *The Journal of Investigative Dermatology* 113, 752–759.
- Bach, J. F. (2005). Infections and autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity* 25, 74–80.
- Bach, J. F. (2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England Journal of Medicine* 347, 911–920.
- Bailey, D. W. (1975). Genetics of histocompatibility in mice. I. New loci and congenic lines. *Immunogenetics* 2, 249–256.
- Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252.
- Baron, U., Floess, S., Wieczorek, G., Baumann, K., Grützkau, A., Dong, J., Thiel, A., Boeld, T. J., Hoffmann, P., Edinger, M., et al. (2007). DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells. *European Journal of Immunology* 37, 2378–2389.
- Barthelmann, J. (2011). Apoptotische Leishmania Major fördern die Krankheitsassoziierte Immunantwort in BALB/c Mäusen. Lübeck, Universität, Dissertation.
- Barthelmann, J., Nietsch, J., Blessenohl, M., Laskay, T., Van Zandbergen, G., Westermann, J., and Kalies, K. (2012). The protective Th1 response in mice is induced in the T-cell zone only three weeks after infection with Leishmania major and not during early T-cell activation. *Medical Microbiology and Immunology* 201, 25–35.
- Bennett, B., Check, I. J., Olsen, M. R., and Hunter, R. L. (1992). A comparison of commercially available adjuvants for use in research. *Journal of Immunological Methods* 153, 31–40.
- Bernard, P., Vaillant, L., Labeille, B., Bedane, C., Arbeille, B., Denoeux, J. P., Lorette, G., Bonnetblanc, J. M., and Prost, C. (1995). Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group. *Archives of Dermatology* 131, 48–52.
- Bode, U., Wonigeit, K., Pabst, R., and Westermann, J. (1997). The fate of activated T cells migrating through the body: rescue from apoptosis in the tissue of origin. *European Journal of Immunology* 27, 2087–2093.
- Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Förster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles,

- and support immunoglobulin production. *The Journal of Experimental Medicine* *192*, 1545–1552.
- Brian, A. A. (1988). Stimulation of B-cell proliferation by membrane-associated molecules from activated T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *85*, 564–568.
- Brines, R. D., and Klaus, G. G. (1993). Polyclonal activation of immature B cells by preactivated T cells: the role of IL-4 and CD40 ligand. *International Immunology* *5*, 1445–1450.
- Casamayor-Palleja, M., Feuillard, J., Ball, J., Drew, M., and MacLennan, I. C. (1996). Centrocytes rapidly adopt a memory B cell phenotype on co-culture with autologous germinal centre T cell-enriched preparations. *International Immunology* *8*, 737–744.
- Casamayor-Palleja, M., Khan, M., and MacLennan, I. C. M. (1995). A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex. *The Journal of Experimental Medicine* *181*, 1293–1301.
- Cerutti, A., Zan, H., Schaffer, A., Bergsagel, L., Harindranath, N., Max, E. E., and Casali, P. (1998). CD40 Ligand and Appropriate Cytokines Induce Switching to IgG, IgA, and IgE and Coordinated Germinal Center and Plasmacytoid Phenotypic Differentiation in a Human Monoclonal IgM+IgD+ B Cell Line. *The Journal of Immunology* *160*, 2154–2157.
- Chen, M., Doostan, A., Bandyopadhyay, P., Remington, J., Wang, X., Hou, Y., Liu, Z., and Woodley, D. T. (2007). The Cartilage Matrix Protein Subdomain of Type VII Collagen Is Pathogenic for Epidermolysis Bullosa Acquisita. *The American Journal of Pathology* *170*, 2009–2018.
- Chiriac, M. T., Roesler, J., Sindrilaru, A., Scharffetter-Kochanek, K., Zillikens, D., and Sitaru, C. (2007). NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *The Journal of Pathology* *212*, 56–65.
- Christensen, J. E., Christensen, J. P., Kristensen, N. N., Hansen, N. J. V., Stryhn, A., and Thomsen, A. R. (2002). Role of CD28 co-stimulation in generation and maintenance of virus-specific T cells. *International Immunology* *14*, 701–711.
- Chitanova, T., Tangye, S. G., Newton, R., Frank, N., Hodge, M. R., Rolph, M. S., and Mackay, C. R. (2004). T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *The Journal of Immunology* *173*, 68–78.
- Collin, M., and Olse, A. (2001). Effect of SpeB and EndoS from *Streptococcus pyogenes* on human immunoglobulins. *Infection and Immunity* *69*, 7187–7189.
- Constant, S., Schweitzer, N., West, J., Ranney, P., and Bottomly, K. (1995). B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4+ T cells to protein antigens in vivo. *The Journal of Immunology* *155*, 3734–3741.

- Cribbs, D. H., Ghochikyan, A., Vasilevko, V., Tran, M., Petrushina, I., Sadzikava, N., Babikyan, D., Kesslak, P., Kieber-Emmons, T., Cotman, C. W., et al. (2003). Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. *International Immunology* 15, 505–514.
- Croxford, A. L., and Buch, T. (2010). Cytokine reporter mice in immunological research: perspectives and lessons learned. *Immunology* 132, 1–8.
- Cyster, J. G. (2005). Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annual Review of Immunology* 23, 127–159.
- Daha, N. A., Banda, N. K., Roos, A., Beurskens, F. J., Bakker, J. M., Daha, M. R., and Trouw, L. A. (2011). Complement activation by (auto-) antibodies. *Molecular Immunology* 48, 1656–1665.
- Dangl, J. L., Wensel, T. G., Morrison, S. L., Stryer, L., Herzenberg, L. A., and Oi, V. T. (1988). Segmental flexibility and complement fixation of genetically engineered chimeric human, rabbit and mouse antibodies. *The EMBO Journal* 7, 1989–1994.
- Dedeoglu, F., Horwitz, B., Chaudhuri, J., Alt, F. W., and Geha, R. S. (2004). Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. *International Immunology* 16, 395–404.
- Defrance, T., Vanbervliet, B., Briere, F., Durand, I., Rousset, F., and Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *The Journal of Experimental Medicine* 175, 671–682.
- Delves, P. J., and Roitt, I. M. (2000a). The immune system - first of two parts. *The New England Journal of Medicine* 343, 37–49.
- Delves, P. J., and Roitt, I. M. (2000b). The immune system - second of two parts. *The New England Journal of Medicine* 343, 108–117.
- Duty, J. A., Szodoray, P., Zheng, N.-Y., Koelsch, K. a, Zhang, Q., Swiatkowski, M., Mathias, M., Garman, L., Helms, C., Nakken, B., et al. (2009). Functional anergy in a subpopulation of naive B cells from healthy humans that express autoreactive immunoglobulin receptors. *The Journal of Experimental Medicine* 206, 139–151.
- Elgueta, R., Benson, M. J., De Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y., and Noelle, R. J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunological Reviews* 229, 152–172.
- Ellebrecht, C. T. (2012). In-vivo-Untersuchung zur Vorhersagbarkeit der Epidermolysis bullosa acquisita im Tiermodell. Lübeck, Universität, Dissertation.
- Eming, R., Nagel, A., Wolff-Franke, S., Podstawa, E., Debus, D., and Hertl, M. (2008). Rituximab exerts a dual effect in pemphigus vulgaris. *The Journal of investigative dermatology* 128, 2850–2858.

- Engineer, L., and Ahmed, A. R. (2001). Emerging treatment for epidermolysis bullosa acquisita. *Journal of the American Academy of Dermatology* 44, 818–828.
- Ey, P. L., Prowse, S. J., and Jenkin, C. R. (1978). Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry* 15, 429–436.
- Feuillard, J., Taylor, D., Casamayor-Palleja, M., Johnson, G. D., and MacLennan, I. C. M. (1995). Isolation and characteristics of tonsil centroblasts with reference to Ig class switching. *International Immunology* 7, 121–130.
- Foy, T. M., Aruffo, A., Bajorath, J., Buhlmann, J. E., and Noelle, R. J. (1996). Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annual Review of Immunology* 14, 591–617.
- Foy, T. M., Laman, J. D., Ledbetter, J. A., Aruffo, A., Claassen, E., and Noelle, R. J. (1994). gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *The Journal of Experimental Medicine* 180, 157–163.
- Foy, T. M., Shepherd, D. M., Durie, F. H., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., and Noelle, R. J. (1993). In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39. *The Journal of Experimental Medicine* 178, 1667–1675.
- Franklin, E. C. (1975). Structure and function of immunoglobulins. *Acta Endocrinologica Supplementum* 194, 77–95.
- Freedman, H. A., and Lilly, F. (1975). Properties of cell lines derived from tumors induced by Friend virus in BALB/c and BALB/c-H-2b mice. *The Journal of Experimental Medicine* 142, 212–223.
- Furue, M., Iwata, M., Yoon, H. I., Kubota, Y., Ohto, H., Kawashima, M., Tsuchida, T., Oohara, K., Tamaki, K., and Kukita, A. (1986). Epidermolysis bullosa acquisita: clinical response to plasma exchange therapy and circulating anti-basement membrane zone antibody titer. *Journal of the American Academy of Dermatology* 14, 873–878.
- Gammon, W. R., Inman, A. O. 3rd, and Wheeler, C. E. J. (1984). Differences in complement-dependent chemotactic activity generated by bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita immune complexes: demonstration by leukocytic attachment and organ culture methods. *The Journal of Investigative Dermatology* 83, 57–61.
- Garside, P., Ingulli, E., Merica, R. R., Johnson, J. G., Noelle, R. J., and Jenkins, M. K. (1998). Visualization of Specific B and T Lymphocyte Interactions in the Lymph Node. *Science* 281, 96–99.
- Gerritse, K., Laman, J. D., Noelle, R. J., Aruffo, A., Ledbetter, J. a, Boersma, W. J., and Claassen, E. (1996). CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 2499–2504.

- Glazier, K. S., Hake, S. B., Tobin, H. M., Chadburn, A., Schattner, E. J., and Denzin, L. K. (2002). Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO. *The Journal of Experimental Medicine* 195, 1063–1069.
- Goodnow, C. C., Sprent, J., De St Groth, B. F., and Vinuesa, C. G. (2005). Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435, 590–597.
- Gordon, J., Millsum, M. J., Guy, G. R., and Ledbetter, J. A. (1988). Resting B lymphocytes can be triggered directly through the CDw40 (Bp50) antigen. A comparison with IL-4-mediated signaling. *The Journal of Immunology* 140, 1425–1430.
- Grammer, A. C., Slota, R., Fischer, R., Gur, H., Girschick, H., Yarboro, C., Illei, G. G., and Lipsky, P. E. (2003). Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions. *The Journal of Clinical Investigation* 112, 1506–1520.
- Hammers, C. M., Bieber, K., Kalies, K., Banczyk, D., Ellebrecht, C. T., Ibrahim, S. M., Zillikens, D., Ludwig, R. J., and Westermann, J. (2011). Complement-Fixing Anti-Type VII Collagen Antibodies Are Induced in Th1-Polarized Lymph Nodes of Epidermolysis Bullosa Acquisita-Susceptible Mice. *The Journal of Immunology* 187, 5043–5050.
- Hardie, D. L., Johnson, G. D., Khan, M., and MacLennan, I. C. M. (1993). Quantitative analysis of molecules which distinguish functional compartments within germinal centers. *European Journal of Immunology* 23, 997–1004.
- Hasbold, J., Hong, J. S.-Y., Kehry, M. R., and Hodgkin, P. D. (1999). Integrating signals from IFN-gamma and IL-4 by B cells: positive and negative effects on CD40 ligand-induced proliferation, survival, and division-linked isotype switching to IgG1, IgE, and IgG2a. *The Journal of Immunology* 163, 4175–4181.
- Hassan, G. S., Merhi, Y., and Mourad, W. M. (2009). CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies. *Trends in Immunology* 30, 165–172.
- Hauser, A. E., Junt, T., Mempel, T. R., Sneddon, M. W., Kleinstein, S. H., Henrickson, S. E., Von Andrian, U. H., Shlomchik, M. J., and Haberman, A. M. (2007). Definition of germinal-center B cell migration in vivo reveals predominant intrazonal circulation patterns. *Immunity* 26, 655–667.
- Hauser, A. E., Kerfoot, S. M., and Haberman, A. M. (2010). Cellular choreography in the germinal center: new visions from in vivo imaging. *Seminars in Immunopathology* 32, 239–255.
- Haynes, N. M., Allen, C. D. C., Lesley, R., Ansel, K. M., Killeen, N., and Cyster, J. G. (2007). Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *The Journal of Immunology* 179, 5099–5108.
- Heinzel, F. P., Sadick, M. D., Holaday, B. J., Coffman, R. L., and Locksley, R. M. (1989). Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or

- progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *The Journal of Experimental Medicine* *169*, 59–72.
- Hennino, A., Berard, M., Casamayor-Palleja, M., Krammer, P. H., and Defrance, T. (2000). Regulation of the Fas death pathway by FLICE-inhibitory protein in primary human B cells. *The Journal of Immunology* *165*, 3023–3030.
- Ho, F., Lortan, J. E., MacLennan, I. C. M., and Khan, M. (1986). Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *European Journal of Immunology* *16*, 1297–1301.
- Hodgkin, P. D., Yamashita, L. C., Coffman, R. L., and Kehry, M. R. (1990). Separation of events mediating B cell proliferation and Ig production by using T cell membranes and lymphokines. *The Journal of Immunology* *145*, 2025–2034.
- Huang, N.-N., Han, S.-B., Hwang, I.-Y., and Kehrl, J. H. (2005). B cells productively engage soluble antigen-pulsed dendritic cells: visualization of live-cell dynamics of B cell-dendritic cell interactions. *The Journal of Immunology* *175*, 7125–7134.
- Huber, R., Deisenhofer, J., Colman, P. M., Matsushima, M., and Walter Palm (1976). Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment. *Nature* *264*, 415–420.
- Hunter, R. L. (2002). Overview of vaccine adjuvants: present and future. *Vaccine* *20*, S7–12.
- Ishii, N., Hamada, T., Dainichi, T., Karashima, T., Nakama, T., Yasumoto, S., Zillikens, D., and Hashimoto, T. (2010). Epidermolysis bullosa acquisita: What's new? *The Journal of Dermatology* *37*, 220–230.
- Jabara, H. H., Fu, S. M., Geha, R. S., and Vercelli, D. (1990). CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. *The Journal of Experimental Medicine* *172*, 1861–1864.
- Jacob, J., Kassir, R., and Kelsoe, G. (1991a). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *The Journal of Experimental Medicine* *173*, 1165–1175.
- Jacob, J., and Kelsoe, G. (1992). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *The Journal of Experimental Medicine* *176*, 679–687.
- Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., and Weiss, U. (1991b). Intracлонаl generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* *354*, 389–392.
- Jin, H., Carrio, R., Yu, A., Malek, T. R., and Alerts, E. (2004). Distinct Activation Signals Determine whether IL-21 Induces B Cell Costimulation, Growth Arrest, or Bim-Dependent Apoptosis. *The Journal of Immunology* *173*, 657–665.

- Kalies, K., Blessenohl, M., Nietsch, J., and Westermann, J. (2006). T Cell Zones of Lymphoid Organs Constitutively Express Th1 Cytokine mRNA : Specific Changes during the Early Phase of an Immune Response. *The Journal of Immunology* *176*, 741–749.
- Kalies, K., König, P., Zhang, Y. M., Deierling, M., Barthelmann, J., Stamm, C., and Westermann, J. (2008). Nonoverlapping expression of IL10, IL12p40, and IFN γ mRNA in the marginal zone and T cell zone of the spleen after antigenic stimulation. *The Journal of Immunology* *180*, 5457–5465.
- Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., and Ravetch, J. V (2006). Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* *313*, 670–673.
- Kasperkiewicz, M., Müller, R., Manz, R. A., Magens, M., Hammers, C. M., Somlai, C., Westermann, J., Schmidt, E., Zillikens, D., Ludwig, R. J., et al. (2011). Heat-shock protein 90 inhibition in autoimmunity to type VII collagen: evidence that nonmalignant plasma cells are not therapeutic targets. *Blood* *117*, 6135–6142.
- Kim, J. H., Kim, Y. H., and Kim, S.-C. (2011). Epidermolysis bullosa acquisita: a retrospective clinical analysis of 30 cases. *Acta Dermato-Venereologica* *91*, 307–312.
- King, C., Tangye, S. G., and Mackay, C. R. (2008). T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annual Review of Immunology* *26*, 741–766.
- Kivity, S., Agmon-Levin, N., Blank, M., and Shoenfeld, Y. (2009). Infections and autoimmunity--friends or foes? *Trends in Immunology* *30*, 409–414.
- Klaus, G. G., Pepys, M. B., Kitajima, K., and Askonas, B. A. (1979). Activation of mouse complement by different classes of mouse antibody. *Immunology* *38*, 687–695.
- Koelsch, K., Zheng, N., and Zhang, Q. (2007). Mature B cells class switched to IgD are autoreactive in healthy individuals. *The Journal of Clinical Investigation* *117*.
- Kofler, H., Wambacher-Gasser, B., Topar, G., Weinlich, G., Schuler, G., Hintner, H., Romani, N., and Fritsch, P. (1997). Intravenous immunoglobulin treatment in therapy-resistant epidermolysis bullosa acquisita. *Journal of the American Academy of Dermatology* *36*, 331–335.
- Koopman, G., Keehnen, R. M., Lindhout, E., Zhou, D. F., De Groot, C., and Pals, S. T. (1997). Germinal center B cells rescued from apoptosis by CD40 ligation or attachment to follicular dendritic cells, but not by engagement of surface immunoglobulin or adhesion receptors, become resistant to CD95-induced apoptosis. *European Journal of Immunology* *27*, 1–7.
- Van Kooten, C., and Banchereau, J. (1997). Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Current Opinion in Immunology* *9*, 330–337.
- Korganow, A. S., Ji, H., Mangialaio, S., Duchatelle, V., Pelanda, R., Martin, T., Degott, C., Kikutani, H., Rajewsky, K., Pasquali, J. L., et al. (1999). From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* *10*, 451–461.

- Koshy, M., Berger, D., and Crow, M. K. (1996). Increased expression of CD40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes. *The Journal of Clinical Investigation* 98, 826–837.
- Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789–795.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lanzavecchia, A. (1985). Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 314, 537–539.
- Lapiere, J. C., Woodley, D. T., Parente, M. G., Iwasaki, T., Wynn, K. C., Christiano, A. M., and Uitto, J. (1993). Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. *The Journal of Clinical Investigation* 92, 1831–1839.
- Lernmark, Å. (2001). Autoimmune diseases: are markers ready for prediction? *The Journal of Clinical Investigation* 108, 1091–1096.
- Lew, W., Bowcock, A. M., and Krueger, J. G. (2004). Psoriasis vulgaris: cutaneous lymphoid tissue supports T-cell activation and “Type 1” inflammatory gene expression. *Trends in Immunology* 25, 295–305.
- Linterman, M. a, Rigby, R. J., Wong, R. K., Yu, D., Brink, R., Cannons, J. L., Schwartzberg, P. L., Cook, M. C., Walters, G. D., and Vinuesa, C. G. (2009). Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine* 206, 561–576.
- Liu, Y. J., Joshua, D. E., Williams, G. T., Smith, C. A., Gordon, J., and MacLennan, I. C. M. (1989). Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342, 929–931.
- Liu, Y. J., Zhang, J., Lane, P. J., Chan, E. Y., and MacLennan, I. C. M. (1991). Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *European Journal of Immunology* 21, 2951–2962.
- Liu, Y.-J., and Banchereau, J. (1997). Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells. *Seminars in Immunology* 9, 235–240.
- Liu, Y.-J., De Bouteiller, O., and Fugier-Vivier, I. (1997). Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. *Current Opinion in Immunology* 9, 256–262.
- Leo, A., Invernizzi, P., Gao, B., Podda, M., and Gershwin, M. E. (2010). Definition of human autoimmunity--autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews* 9, A259–66.
- Ludwig, R. J., Recke, A., Bieber, K., Müller, S., De Costro Marques, A., Banczyk, D., Hirose, M., Kasperkiewicz, M., Ishii, N., Schmidt, E., et al. (2010). Generation of antibodies of

- distinct subclasses and specificity is linked to H2s in an active mouse model of epidermolysis bullosa acquisita. *Journal of Investigative Dermatology* 38, 1–10.
- Lund, F., and Randall, T. (2010). Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nature Reviews Immunology* 10, 236–247.
- Luzina, I. G., Atamas, S. P., Storrer, C. E., Ludmila, C., Kelsoe, G., Papadimitriou, J. C., and Handwerker, B. S. (2001). Spontaneous formation of germinal centers in autoimmune mice. *Journal of Leukocyte Biology* 70, 578–584.
- Ma, C. S., Nichols, K. E., and Tangye, S. G. (2007). Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annual Review of Immunology* 25, 337–379.
- Macaulay, A. E., Dekruyff, R. H., Goodnow, C. C., and Umetsu, D. T. (1997). Antigen-specific B cells preferentially induce CD4+ T cells to produce IL-4. *The Journal of Immunology* 158, 4171–4179.
- MacLennan, I. C. M. (1994). Germinal Centers. *Annual Review of Immunology* 12, 117–139.
- MacLennan, I. C. M., and Gray, D. (1986). Antigen-driven selection of virgin and memory B cells. *Immunological Reviews* 91, 61–85.
- MacLennan, I. C. M., Gulbranson-Judge, A., Toellner, K. M., Casamayor-Palleja, M., Chan, E., Sze, D. M., Luther, S. A., and Orbea, H. a (1997). The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop. *Immunological Reviews* 156, 53–66.
- MacLennan, I. C. M., Liu, Y. J., Oldfield, S., Zhang, J., and Lane, P. J. (1990). The evolution of B-cell clones. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 159, 37–63.
- Manser, T. (2004). Textbook germinal centers? *The Journal of Immunology* 172, 3369–3375.
- Matloubian, M., Lo, C. G., Cinamon, G., Lesneski, M. J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M. L., Proia, R. L., and Cyster, J. G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427, 355–360.
- Matsuzawa, A., Hattori, K., Aoki, J., Arai, H., and Inoue, K. (1997). Protection against oxidative stress-induced cell death by intracellular platelet-activating factor-acetylhydrolase II. *The Journal of biological chemistry* 272, 32315–32320.
- McHeyzer-Williams, L. J., Pelletier, N., Mark, L., Fazilleau, N., and McHeyzer-Williams, M. G. (2009). Follicular helper T cells as cognate regulators of B cell immunity. *Current Opinion in Immunology* 21, 266–273.
- Meffre, E., and Wardemann, H. (2008). B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* 20, 632–638.

- Mihai, S., Chiriac, M. T., Takahashi, K., Thurman, J. M., Holers, V. M., Zillikens, D., Botto, M., and Sitaru, C. (2007). The alternative pathway of complement activation is critical for blister induction in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *The Journal of Immunology* *178*, 6514–6521.
- Miller, M. J., Safrina, O., Parker, I., and Cahalan, M. D. (2004). Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *The Journal of Experimental Medicine* *200*, 847–856.
- Mills, D. M., and Cambier, J. C. (2003). B lymphocyte activation during cognate interactions with CD4+ T lymphocytes: molecular dynamics and immunologic consequences. *Seminars in Immunology* *15*, 325–329.
- Morris, S. C., Lees, A., and Finkelman, F. D. (1994). In vivo activation of naive T cells by antigen-presenting B cells. *The Journal of Immunology* *152*, 3777–3785.
- Murphy, K. M., Heimberger, A. B., and Loh, D. Y. (1990). Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α 0 thymocytes in vivo. *Science* *250*, 1720–1723.
- Nachbar, L. B. (2000). Proliferation und Apoptose in den Kompartimenten der Rattenmilz nach Injektion in vitro aktivierter T-Effektorzellen. Hannover, Universität, Dissertation.
- Niedermeier, A., Eming, R., Pfützte, M., Neumann, C. R., Happel, C., Reich, K., and Hertl, M. (2007). Clinical response of severe mechanobullous epidermolysis bullosa acquisita to combined treatment with immunoabsorption and rituximab (anti-CD20 monoclonal antibodies). *Archives of Dermatology* *143*, 192–198.
- Nielen, M. M. J., Van Schaardenburg, D., Reesink, H. W., Van de Stadt, R. J., Van der Horst-Bruinsma, I. E., De Koning, M. H. M. T., Habibuw, M. R., Vandenbroucke, J. P., and Dijkmans, B. a C. (2004). Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis and Rheumatism* *50*, 380–386.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J. V (2008). Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annual Review of Immunology* *26*, 513–533.
- Noelle, R. J., Daum, J., Bartlett, W. C., McCann, J., and Shepherd, D. M. (1991). Cognate interactions between helper T cells and B cells. V. Reconstitution of T helper cell function using purified plasma membranes from activated Th1 and Th2 T helper cells and lymphokines. *The Journal of Immunology* *146*, 1118–1124.
- Noelle, R. J., Roy, M., Shepherd, D. M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J. A., and Aruffo, A. (1992). A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *89*, 6550–6554.
- Oefner, C. M., Winkler, A., Hess, C., Lorenz, A. K., Holecska, V., Huxdorf, M., Schommartz, T., Petzold, D., Bitterling, J., Schoen, A. L., et al. (2012). Tolerance induction with T cell-

- dependent protein antigens induces regulatory sialylated IgGs. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* *129*, 1647–1655.
- Okada, T., Miller, M. J., Parker, I., Krummel, M. F., Neighbors, M., Hartley, S. B., O’Garra, A., Cahalan, M. D., and Cyster, J. G. (2005). Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biology* *3*, 1047–1061.
- O’Shea, J., Ma, A., and Lipsky, P. (2002). Cytokines and autoimmunity. *Nature Reviews. Immunology* *2*, 37–45.
- Pape, K. A., Catron, D. M., Itano, A. A., and Jenkins, M. K. (2007). The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity* *26*, 491–502.
- Parekh, R. B., Dwek, R. A., Sutton, B. J., Fernandes, D. L., Leung, A., Stanworth, D., Rademacher, T. W., Mizuochi, T., Taniguchi, T., Matsuta, K., et al. (1985). Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* *316*, 452–457.
- Perona-Wright, G., Mohrs, K., and Mohrs, M. (2010). Sustained signaling by canonical helper T cell cytokines throughout the reactive lymph node. *Nature Immunology* *11*, 520–526.
- Qi, H., Cannons, J. L., Klauschen, F., Schwartzberg, P. L., and Germain, R. N. (2008). SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* *455*, 764–769.
- Radant, K. (2008). Digitale Bildanalyse von Proliferations- und Differenzierungsmarkern in der Epidermis gesunder, entzündlich veränderter oder aktinisch geschädigter Haut. Halle-Wittenberg, Universität, Dissertation.
- Rahman, A., and Isenberg, D. A. (2008). Systemic lupus erythematosus. *The New England Journal of Medicine* *358*, 329–339.
- Ranheim, E. A., and Kipps, T. J. (1993). Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *The Journal of Experimental Medicine* *177*, 925–935.
- Rathmell, J. C., Townsend, S. E., Xu, J. C., Flavell, R. A., and Goodnow, C. C. (1996). Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* *87*, 319–329.
- Reif, K., Ekland, E. H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M., Förster, R., and Cyster, J. G. (2002). Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* *416*, 94–99.
- Remington, J., Chen, M., Burnett, J., and Woodley, D. T. (2008). Autoimmunity to type VII collagen: epidermolysis bullosa acquisita. *Current Directions in Autoimmunity* *10*, 195–205.

- Renshaw, B. R., Fanslow, W. C., Armitage, R. J., Campbell, K. A., Liggitt, D., Wright, B., Davison, B. L., and Maliszewski, C. R. (1994). Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine* 180, 1889–1900.
- Riley, J. L., and June, C. H. (2005). The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood* 105, 13–21.
- Rioux, J. D., and Abbas, A. K. (2005). Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. *Nature* 435, 584–589.
- Robbins, W. C., Holman, H. R., Deicher, H., and Kunkel, H. G. (1957). Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 575–579.
- Robert, C., and Kupper, T. (1999). Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *The New England Journal of Medicine* 341, 1817–1828.
- Rock, K. L., Benacerraf, B., and Abbas, A. K. (1984). Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. I. Role of surface immunoglobulin receptors. *The Journal of Experimental Medicine* 160, 1102–1113.
- Rodríguez-Pinto, D., and Moreno, J. (2005). B cells can prime naive CD4+ T cells in vivo in the absence of other professional antigen-presenting cells in a CD154-CD40-dependent manner. *European Journal of Immunology* 35, 1097–1105.
- Rose, M. L., Birbeck, M. S., Wallis, V. J., Forrester, J. A., and Davies, A. J. (1980). Peanut lectin binding properties of germinal centres of mouse lymphoid tissue. *Nature* 284, 364–366.
- Rose, N. R., and Bona, C. (1993). Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunology Today* 14, 426–430.
- Schrader, C. E., Stavnezer, J., Kikutani, H., and Parker, D. C. (1997). Cognate T cell help for CD40-deficient B cells induces c-myc RNA expression, but DNA synthesis requires an additional signal through surface Ig. *The Journal of Immunology* 158, 153–162.
- Schönbeck, U., and Libby, P. (2001). The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 4–43.
- Sfikakis, P. P., Boletis, J. N., Lionaki, S., Vigiaklis, V., Fragiadaki, K. G., Iniotaki, A., and Moutsopoulos, H. M. (2005). Remission of proliferative lupus nephritis following B cell depletion therapy is preceded by down-regulation of the T cell costimulatory molecule CD40 ligand: an open-label trial. *Arthritis and Rheumatism* 52, 501–513.
- Sfriso, P., Ghirardello, A., Botsios, C., Tonon, M., Zen, M., Bassi, N., Bassetto, F., and Doria, A. (2010). Infections and autoimmunity: the multifaceted relationship. *Journal of Leukocyte Biology* 87, 385–395.
- Sitaru, A. G., Sesarman, A., Mihai, S., Chiriac, M. T., Zillikens, D., Hultman, P., Solbach, W., and Sitaru, C. (2010). T cells are required for the production of blister-inducing

- autoantibodies in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *The Journal of Immunology* *184*, 1596–1603.
- Sitaru, C., Chiriac, M. T., Mihai, S., Büning, J., Gebert, A., Ishiko, A., and Zillikens, D. (2006). Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice. *The Journal of Immunology* *177*, 3461–3468.
- Sitaru, C., Kromminga, A., Hashimoto, T., Bröcker, E. B., and Zillikens, D. (2002). Autoantibodies to type VII collagen mediate Fcγ-dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *The American Journal of Pathology* *161*, 301–311.
- Sitaru, C., Mihai, S., Otto, C., Chiriac, M. T., Hausser, I., Dotterweich, B., Saito, H., Rose, C., Ishiko, A., and Zillikens, D. (2005). Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *The Journal of Clinical Investigation* *115*, 870–878.
- Sitaru, C., and Zillikens, D. (2005). Mechanisms of blister induction by autoantibodies. *Experimental Dermatology* *14*, 861–875.
- Stamm, C. (2011). Einfluss der Antigendosis auf die Induktion unterschiedlicher T-Helfer-Zellpopulationen : Analyse der Zytokinexpression in der murinen Milz nach Immunisierung mit Schaferythrozyten. Lübeck, Universität, Dissertation.
- Stavnezer, J., Guikema, J. E., and Schrader, C. E. (2008). Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination. *Annual Review of Immunology* *26*, 261–292.
- Stills, H. F. (2005). Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* *46*, 280–293.
- Stöcker, W., Teegen, B., Meyer, W., Müller-Kunert, E., Proost, S., Schlumberger, W., and Sonnenberg, K. (1998). Differenzierte Autoantikörper-Diagnostik mit BIOCHIP-Mosaiken. *Autoantikörper (Conrad K, ed)*. Lengerich, Pabst, 78–99.
- Tal, M., Silberstein, A., and Nusser, E. (1985). Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer. *The Journal of Biological Chemistry* *260*, 9976–9980.
- Tarlinton, D. M. (2008). Evolution in miniature: selection, survival and distribution of antigen reactive cells in the germinal centre. *Immunology and Cell Biology* *86*, 133–138.
- Tobón, G. J., Pers, J.-O., Cañas, C. A., Rojas-Villarraga, A., Youinou, P., and Anaya, J.-M. (2011). Are autoimmune diseases predictable? *Autoimmunity Reviews* *11*, 259–266.
- Toubi, E., and Shoenfeld, Y. (2004). The role of CD40-CD154 interactions in autoimmunity and the benefit of disrupting this pathway. *Autoimmunity* *37*, 457–464.

- Uysal, H., Bockermann, R., Nandakumar, K. S., Sehnert, B., Bajtner, E., Engström, A., Serre, G., Burkhardt, H., Thunnissen, M. M. G. M., and Holmdahl, R. (2009). Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis. *The Journal of experimental medicine* *206*, 449–462.
- Victora, G. D., Schwickert, T. A., Fooksman, D. R., Kamphorst, A. O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M. L., and Nussenzweig, M. C. (2010). Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* *143*, 592–605.
- Vinuesa, C. G., Cook, M. C., Angelucci, C., Athanasopoulos, V., Rui, L., Hill, K. M., Yu, D., Domaschütz, H., Whittle, B., Lambe, T., et al. (2005a). A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature* *435*, 452–458.
- Vinuesa, C. G., Cook, M. C., Ball, J., Drew, M., Sunners, Y., Cascalho, M., Wabl, M., Klaus, G. B., and MacLennan, I. C. M. (2000). Germinal centers without T cells. *The Journal of Experimental Medicine* *191*, 485–493.
- Vinuesa, C. G., and Cyster, J. G. (2011). How T cells earn the follicular rite of passage. *Immunity* *35*, 671–680.
- Vinuesa, C. G., Linterman, M. A., Goodnow, C. C., and Randall, K. L. (2010). T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. *Immunological Reviews* *237*, 72–89.
- Vinuesa, C. G., Sanz, I., and Cook, M. C. (2009). Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nature Reviews. Immunology* *9*, 845–857.
- Vinuesa, C. G., Tangye, S. G., Moser, B., and Mackay, C. R. (2005b). Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nature Reviews. Immunology* *5*, 853–865.
- Walker, L. S. K., and Abbas, A. K. (2002). The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nature Reviews. Immunology* *2*, 11–19.
- Weber, M., Prod'homme, T., Patarroyo, J. C., Molnarfi, N., Karnezis, T., Lehmann-Horn, K., Danilenko, D. M., Eastham-Anderson, J., Slavin, A. J., Linington, C., et al. (2010). B-cell activation influences T-cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity. *Annals of Neurology* *68*, 369–383.
- Wheeler, K., Pound, J. D., Gordon, J., and Jefferis, R. (1993). Engagement of CD40 lowers the threshold for activation of resting B cells via antigen receptor. *European Journal of Immunology* *23*, 1165–1168.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation* *80*, 617–653.

- Woodley, D. T., Briggaman, R. A., O'Keefe, E. J., Inman, A. O., Queen, L. L., and Gammon, W. R. (1984). Identification of the skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. *The New England Journal of Medicine* *310*, 1007–1013.
- Woodley, D. T., Burgeson, R. E., Lunstrum, G., Bruckner-Tuderman, L., Reese, M. J., and Briggaman, R. A. (1988). Epidermolysis bullosa acquisita antigen is the globular carboxyl terminus of type VII procollagen. *The Journal of Clinical Investigation* *81*, 683–687.
- Woodley, D. T., Sarret, Y., and Briggaman, R. A. (1991). Autoimmunity to type VII collagen. *Seminars in Dermatology* *10*, 232–239.
- Wykes, M., Pombo, A., Jenkins, C., and MacPherson, G. G. (1998). Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *The Journal of Immunology* *161*, 1313–1319.
- Xu, J., Fey, T. M., Laman, J. D., Elliott, E. A., Dunn, J. J., Waldschmidt, T. J., Elsemore, J., Noelle, R. J., and Flavell, R. A. (1994). Mice Deficient for the CD40 Ligand. *Immunity* *1*, 423–431.
- Yang, Y., and Wilson, J. M. (1996). CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science* *273*, 1862–1864.
- Yaoita, H., Briggaman, R. A., Lawley, T. J., Provost, T. T., and Katz, S. I. (1981). Epidermolysis Bullosa Acquisita: Ultrastructural and Immunological Studies. *Journal of Investigative Dermatology* *76*, 288–292.
- Zhou, L., Chong, M. M. W., and Littman, D. R. (2009). Review Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* *30*, 646–655.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1–1: Die Pathogenese der Epidermolysis bullosa acquisita mit Modulationsansatz.....	3
Abb. 1–2: Zellkontakte bei der Bildung einer Keimzentrumsreaktion in sekundärem lymphatischem Gewebe.....	8
Abb. 2–1: SDS-PAGE der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine.....	36
Abb. 3–1: Der Versuchsaufbau zur Induktion von Keimzentren nach Zelltransfer.	41
Abb. 3–2: Die durchflusszytometrische Analyse der ruhenden sowie der <i>in vitro</i> stimulierten Lymphozyten.	43
Abb. 3–3: Die Keimzentren entstehen sechs Tage nach Transfer <i>in vitro</i> stimulierter Lymphozyten.	45
Abb. 3–4: Die Keimzentrumsreaktion ist in BALB/c signifikant stärker ausgeprägt als in C57BL/6.....	46
Abb. 3–5: Die Kinetik der Keimzentrumsentstehung in BALB/c-Mäusen.....	47
Abb. 3–6: Die Anzahl der T-Zellen innerhalb des Keimzentrums ist in verglichenen Tiermodellen unverändert.	48
Abb. 3–7: Die Hitze- und Ultraschallbehandlung tötet die Lymphozyten.	49
Abb. 3–8: Die Keimzentren werden durch stimulierte und lebende Lymphozyten induziert, nicht jedoch durch tote Zellen.	50
Abb. 3–9: Die Induktion von Keimzentren erfolgte unabhängig vom T-Zellrezeptorrepertoire.....	51
Abb. 3–10: Transfer aktivierter Lymphozyten induziert Produktion von Autoantikörpern.	52
Abb. 3–11: Die Aktivierung von Lymphozyten ist CD154-unabhängig, die Bildung der Keimzentren jedoch CD154-abhängig.....	53
Abb. 3–12: Die Separation der T-Zellfraktionen.....	54
Abb. 3–13: Isolierte T-Zellfraktionen induzieren keine Keimzentren.	55
Abb. 3–14: Die B-Zellen müssen in Kultur durch T-Zellen aktiviert werden, um Keimzentren zu bilden.....	56
Abb. 3–15: Die Keimzentren werden durch exogen transferierte B-Zellen gebildet.	57
Abb. 3–16: Die gebildeten Keimzentren sind größtenteils exogenen Ursprungs.....	58

Abb. 3–17: Ruhende CD154-kompetente CD4⁺ T-Zellen leisten Hilfe bei der Bildung von Keimzentren in CD154-defizienten Tieren.	59
Abb. 3–18: Der Versuchsaufbau zur Modulation der Epidermolysis bullosa acquisita.	60
Abb. 3–19: Der EBA-Phänotyp kann durch eine Vorbehandlung mit einem Antigen verhindert werden.	61
Abb. 3–20: Vorbehandlung mit Kollagen-Typ-VII senkt die Autoantikörper-Titer im Blut.	63
Abb. 3–21: Der Schutz durch Vorbehandlung mit Ovalbumin, einem EBA-unabhängigen Protein.	64
Abb. 3–22: Die zirkulierenden Antikörper korrelieren nicht mit dem Krankheitsverlauf. ...	66
Abb. 3–23: Kein Unterschied in der Ablagerung von IgGs und C3 an die dermo-epidermale Junktionszone.	68
Abb. 3–24: Die IgG Fc-Sialylierung korrelierte nicht mit dem EBA-Phänotyp.	69
Abb. 3–25: Durch die Ovalbuminvorbehandlung wird IL4 hochreguliert, aber IFNγ herunter reguliert.	71
Abb. 4–1: T-Zellhilfe in der Haut induziert Epidermolysis bullosa acquisita.	84
Abb. A–1: Der Anteil der B-Zellen korreliert nicht mit der Keimzentrumsbildung.	I
Abb. A–2: CD154-kompetente T-Zellen des Empfängers liefern die für Keimzentrumsbildung notwendige Hilfe.	II
Abb. A–3: CD4⁺ T-Zellen induzieren keine Keimzentren.	III
Abb. A–4: Ovalbumin in Aluminiumhydroxid ohne Titermax reduziert den klinischen Verlauf der Epidermolysis bullosa acquisita.	IV
Abb. A–5: Die zirkulierenden Autoantikörper korrelieren nicht mit dem Krankheitsverlauf.	V
Abb. A–6: Die Kinetik der zirkulierenden Autoantikörper im Blut.	VI

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2–1: In der Quantitativen Real-Time RT-PCR eingesetzten Oligonukleotide.....	19
Tab. 2–2: Schema zur Vorbehandlung und Immunisierung der Versuchstiere	26
Tab. 2–3: Verdünnungen der in der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper	28
Tab. 2–4: Trenn- und Sammelgel für die diskontinuierliche Gelelektrophorese.....	37
Tab. 3–1: Der Vergleich der Lymphozyten vor und nach <i>in vitro</i> Stimulation.....	43

A) ERGÄNZENDE DATEN

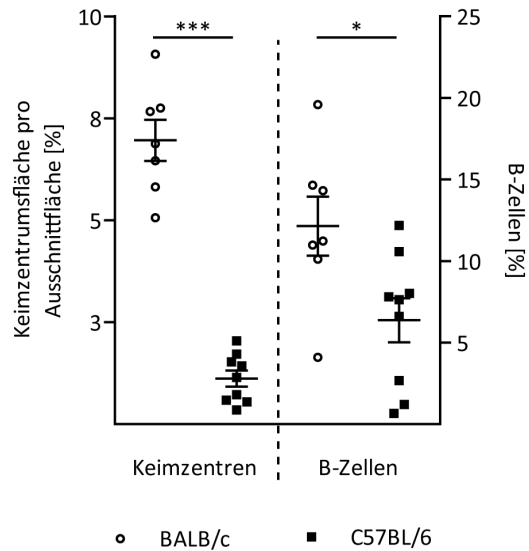


Abb. A-1: Der Anteil der B-Zellen korreliert nicht mit der Keimzentrumsbildung. Die Keimzentrumsbildung der Versuchstiere einer Gruppe wurde gemittelt, um sie den Daten der Durchflusszytometrie zuordnen zu können. Mittels der Durchflusszytometrie wurde nach der *in vitro* Stimulation von BALB/c- und C57BL/6-Lymphozyten der Anteil der B-Zellen in den transferierten Lymphozyten bestimmt. Je Mausstamm lassen sich die Daten auf vier unabhängige Experimente zurückführen. Beruhend auf unabhängigen Gruppen innerhalb eines Experiments ergibt sich daraus: BALB/c n = 7 und C57BL/6 n = 9. Keine Korrelation zwischen der Intensität der Keimzentrumsbildung und injizierter B-Zellzahl mit der Spearman Analyse. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleiche zwischen den beiden Mausstämmen mittels Mann-Whitney-U-Test, *p < 0,05; ***p < 0,001.

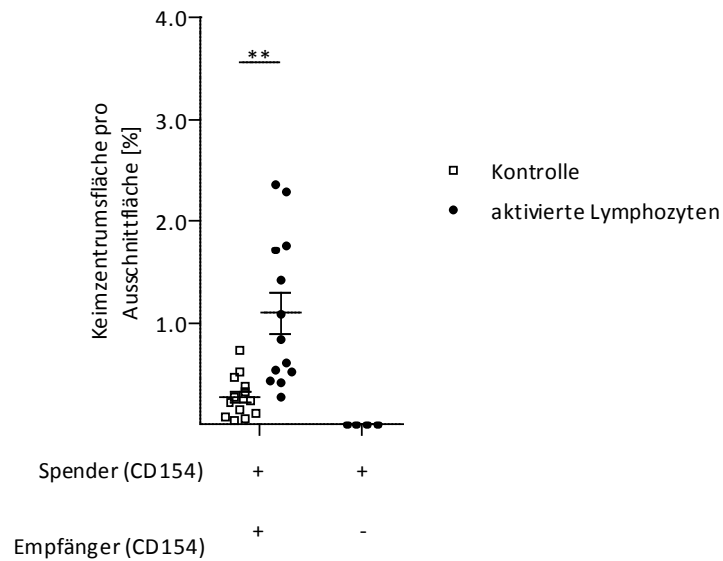


Abb. A-2: CD154-kompetente T-Zellen des Empfängers liefern die für Keimzentrationbildung notwendige Hilfe. Kontrolltieren wurde PBS intravenös injiziert. Lymphozyten von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen wurden *in vitro* stimuliert und in naive C57BL/6- sowie CD154-Knockout-Mäuse transferiert. Versuchstieren wurden an Tag sechs nach Transfer die Milzen entnommen. Untersuchung der Keimzentrationbildung erfolgte durch eine quantitative Analyse mit ImageJ. wt in wt (Kontrolle) [2]: n = 13 (13) und wt in CD154 KO [1]: n = 6. Die []-Klammern geben die Anzahl der Experimente an. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleich mittels 1-way ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test, **p < 0,01. KO: Knockout, wt: Wildtyp.

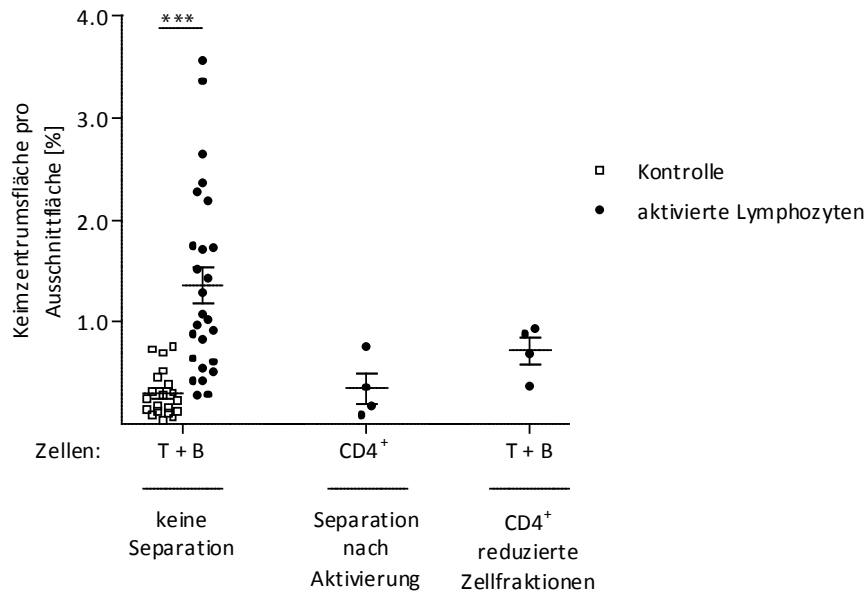


Abb. A-3: CD4⁺ T-Zellen induzieren keine Keimzentren. Kontrolltieren wurden ruhende Lymphozyten oder PBS intravenös injiziert. Nicht separierte Lymphozyten wurden nach *in vitro* Stimulation in naive C57BL/6-Mäuse transferiert. CD4⁺ T-Zellen wurden nach Kultur separiert und ebenfalls in naive Tiere transferiert. Zur Kontrolle wurden ebenfalls die um CD4⁺ T-Zellen reduzierte Fraktion transferiert. An Tag sechs wurden die Milzen für die Analyse der Keimzentrumsentwicklung entnommen. Nicht separierte Lymphozyten (Kontrolle): n = 26 (20), CD4⁺ T-Zellen: n = 4, CD4⁺ T-Zellreduzierte Fraktion: n = 4. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleich mittels 1-way ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test, *p < 0,05, ***p < 0,001.

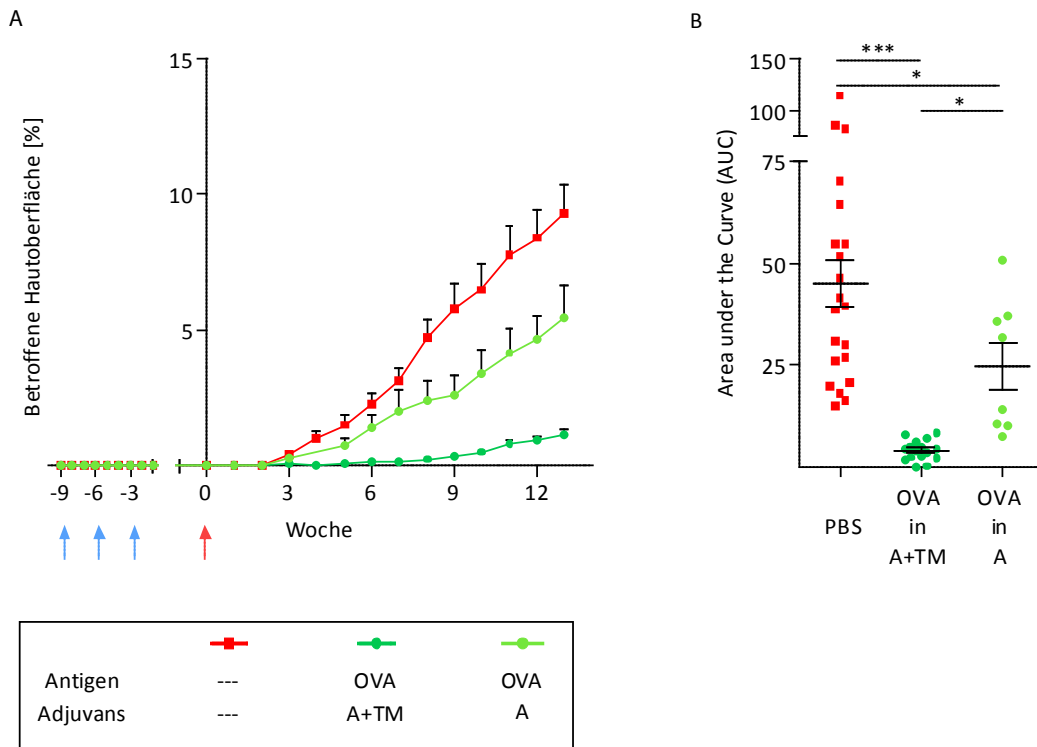


Abb. A-4: Ovalbumin in Aluminiumhydroxid ohne Titermax reduziert den klinischen Verlauf der Epidermolysis bullosa acquisita. Versuchstiere wurden mit PBS, Ovalbumin in Aluminiumhydroxid und Titermax sowie mit Ovalbumin allein in Aluminiumhydroxid vorbehandelt. A: Krankheitsverlauf. B: *Area under the Curve*. PBS-Gruppe [3]: n = 21, OVA in A+TM-Gruppe [2]: n = 16, OVA in A-Gruppe [1]: n = 8. Die []-Klammern geben die Anzahl der Experimente an. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleich mittels 1-way ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test, *p < 0,05; ***p < 0,001. A: Aluminiumhydroxid, OVA: Ovalbumin, TM: Titermax.

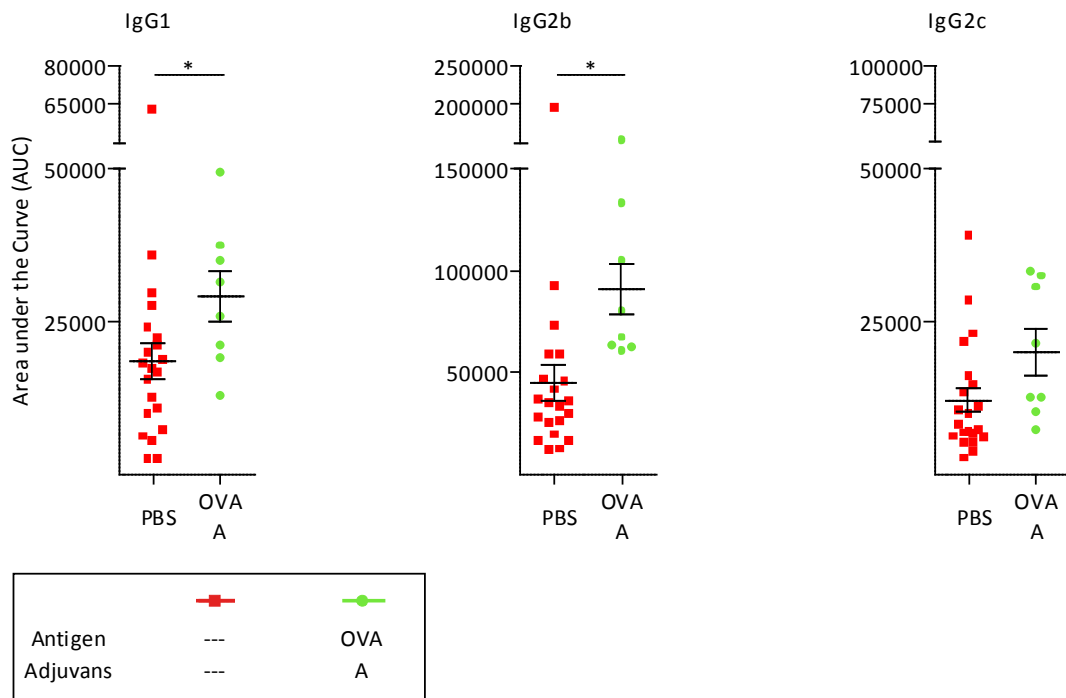


Abb. A-5: Die zirkulierenden Autoantikörper korrelieren nicht mit dem Krankheitsverlauf. Versuchstiere wurden mit PBS oder mit Ovalbumin in Aluminiumhydroxid vorbehandelt. Mit einem Kollagen-Typ-VII-spezifischen ELISA wurden die IgG-Subklassen im Plasma quantifiziert und als *Area under the Curve* dargestellt. PBS-Gruppe [3]: n = 21, OVA in A-Gruppe [1]: n = 8. Die []-Klammern geben die Anzahl der Experimente an. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleich mittels 1-way ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test, *p < 0,05. A: Aluminiumhydroxid, OVA: Ovalbumin.

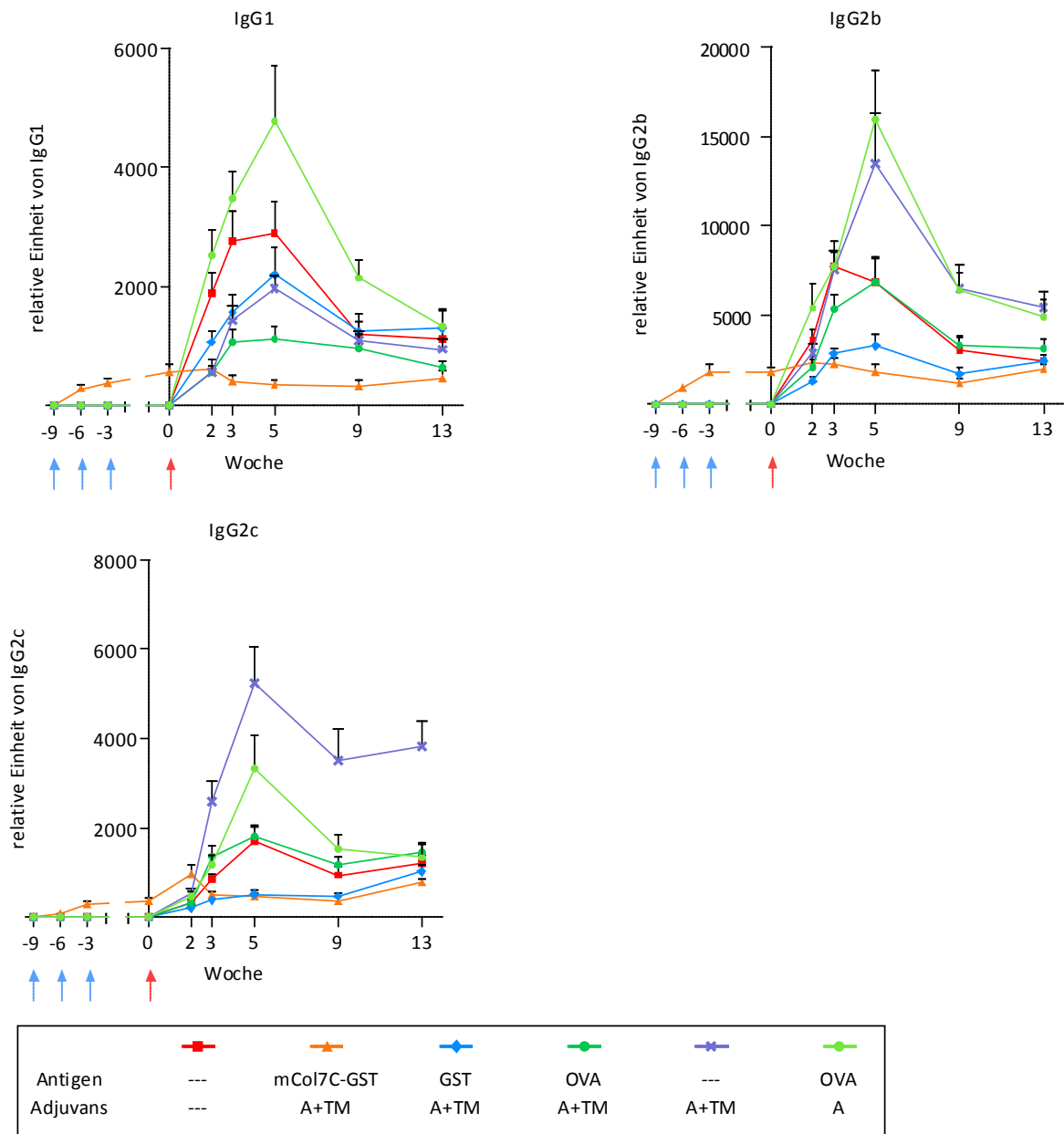


Abb. A-6: Die Kinetik der zirkulierenden Autoantikörper im Blut. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Autoantikörpertiter der Subklassen IgG1, IgG2b und IgG2c mit einem Kollagen-Typ-VII-spezifischen ELISA im Plasma quantifiziert. PBS-Gruppe [3]: n = 21, mCol7C-GST-Gruppe [2]: n = 18, GST-Gruppe [2]: n = 13, OVA- (A+TM)-Gruppe [2]: n = 16, A+TM-Gruppe [2]: n = 14, OVA- (A) -Gruppe [1]: n = 8. Die []-Klammern geben die Anzahl der Experimente an. Mittelwerte mit Standardfehler. Vergleich mittels 1-way ANOVA mit Dunnett Post-Hoc-Test, **p < 0,01; . mCol7C-GST: murines Kollagen-Typ-VII in Aluminiumhydroxid und Titermax, A: Aluminiumhydroxid, A+TM: Aluminiumhydroxid und Titermax, GST: Glutathion-S-Transferase, OVA: Ovalbumin.

B) DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit einen Beitrag geleistet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Westermann für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, die Übergabe des interessanten Themas meiner Dissertation sowie der Bereitstellung aller Mittel und Arbeitsmaterialien. Ich danke ihm für die Unterstützung sowie die Möglichkeit der offenen Diskussion zu kritischen Punkten meiner Arbeit. Ich bedanke mich bei Dr. rer. physiol. Katja Bieber, die in den Anfängen meiner Arbeit die Betreuung übernommen hat und mich in die Methoden und das Thema eingeführt hat. Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie, die mich fachlich, aber auch seelisch unterstützt haben. Ohne die Hilfe wäre die Arbeit in dieser Form nicht zu bewerkstelligen.

Ebenfalls möchte ich mich bedanken bei Herrn Prof. Dr. med. Detlef Zillikens, Prof. Dr. med. Ralf Ludwig sowie Prof. Dr. med. Saleh Ibrahim aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie des UKSH, Campus Lübeck. Sie hatten stets ein offenes Ohr für meine Ergebnisse und Fragen und wiesen mich auf den rechten Weg. Ich bedanke für die ausgezeichnete Kooperation mit der Dermatologie, die in jeder Form, geistig sowie materiell, hilfreich war. Ich danke den Mitarbeitern des ISEF Instituts, vor allem Prof. Dr. Marc Ehlers, der mir im Bereich der Zuckeranlyse und der Auswertung der Daten äußerst hilfreich zur Seite stand.

Ich danke meiner Familie, die mich immer, auch in schwierigen Phasen, unterstützt und ertragen hat. Nie haben sie den Glauben an der Fertigstellung dieser Arbeit verloren.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Frau danken, die mit mir diese herausfordernde Zeit durchgestanden hat und immer hinter mir stand. Immer fand sie die richtigen Worte und Gesten, um mich aufs Neue zu motivieren.

Danke.

C) PUBLIKATIONEN

- Banczyk D**, Nachbar LB, Bergmann L, Bode U, Steven P, König P, Kalies K, Bell E, Westermann J. CD4 T-cell subsets enter the splenic T-cell zone with comparable selectivity: Activated T cells prime B cells MHC class II and CD154 independently and induce germinal centers that produce autoantibodies. *Manuskript in Vorbereitung*
- Hammers CM, Bieber K, Kalies K, **Banczyk D**, Ellebrecht CT, Ibrahim SM, Zillikens D, Ludwig RJ, Westermann J. (2011). Complement-fixing anti-type VII collagen antibodies are induced in Th1-polarized lymph nodes of epidermolysis bullosa acquisita-susceptible mice. *Journal of Immunology* 187, 5043-50.
- Ludwig RJ, Recke A, Bieber K, Müller S, Marques Ade C, **Banczyk D**, Hirose M, Kasperkiewicz M, Ishii N, Schmidt E, Westermann J, Zillikens D, Ibrahim SM. (2011). Generation of antibodies of distinct subclasses and specificity is linked to H2s in an active mouse model of epidermolysis bullosa acquisita. *The Journal of Investigative Dermatology* 131, 167-76.
- Bach M, Grigat S, Pawlik B, Fork C, Utermöhlen O, Pal S, **Banczyk D**, Lazar A, Schömig E, Gründemann D. (2007). Fast set-up of doxycycline-inducible protein expression in human cell lines with a single plasmid based on Epstein-Barr virus replication and the simple tetracycline repressor. *The FEBS Journal* 274, 783-90.

D) 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.

David Michael Banczyk

Köln, 2012