

Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. D. Zillikens

**Untersuchung über den Einfluss verschiedener Leukozytenpopulationen
in der Pathogenese
des bullösen Pemphigoids und der Epidermolysis bullosa acquisita**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Andre Lunz
aus Moskau

Lübeck 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ralf Ludwig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Manz

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2015

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 06.07.2015

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Meiner Mama Alla und meinem Papa Michael

„Wenn die Menschen nur über das sprächen, was sie begreifen,
dann würde es sehr still auf der Welt sein.“

—Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Blasenbildende Autoimmundermatosen.....	6
1.2	Das bullöse Pemphigoid (BP).....	9
1.2.1	Epidemiologie.....	9
1.2.2	Ätiologie und Pathogenese.....	9
1.2.3	Klinik.....	14
1.2.4	Diagnostik.....	16
1.2.5	Therapie.....	19
1.2.6	Prognose.....	21
1.3	Die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA).....	23
1.3.1	Epidemiologie.....	23
1.3.2	Ätiologie und Pathogenese.....	23
1.3.3	Klinik.....	28
1.3.4	Diagnostik.....	29
1.3.5	Therapie.....	30
1.3.6	Prognose.....	33
1.4	Ziele dieser Arbeit.....	34
2	Material und Methoden.....	35
2.1	Ethik-Kommission, Verwendung humaner Biomaterialien (Serum, Zellen, Haut).....	35
2.2	Isolierung von peripheren Leukozytenpopulationen.....	36
2.2.1	Isolierung von peripheren Gesamtleukozyten mittels Dextran.....	36
2.2.2	Auftrennung in PBMC und PMN mittels Polymorphprep.....	37
2.2.3	Isolierung von Monozyten aus PBMC mittels MACS.....	39
2.2.4	Vitalitätsprüfung und Zellzahlbestimmung der isolierten Leukozytenpopulationen:.....	42
2.2.5	Reinheitsbestimmung der isolierten Leukozytenpopulationen mittels FACS.....	43
2.3	Kryoschnitt-Assay.....	44
2.3.1	Prinzip des Kryoschnitt-Assays.....	44
2.3.2	Kontrollseren für den Kryoschnitt-Assay.....	45
2.3.3	Kryoschnitte.....	46
2.3.4	Durchführung des Kryoschnitt-Assays.....	46

2.4	ROS-Assay.....	49
2.4.1	Prinzip des ROS-Assays.....	49
2.4.2	Durchführung des ROS-Assays.....	50
2.5	Zytokin-Assay.....	53
2.5.1	Prinzip des Zytokin-Assays.....	53
2.5.2	Durchführung des Zytokin-Assays.....	53
3	Ergebnisse.....	56
3.1	Ausmaß der dermo-epidermalen Spaltbildung in Abhängigkeit von den verwendeten Leukozytensubpopulationen im Kryoschnitt-Assay.....	56
3.2	ROS-Ausschüttung aus aktivierten Monozyten im ROS-Assay.....	62
3.3	Zytokin-Ausschüttung aus aktivierten Monozyten im Zytokin-Assay.....	65
4	Diskussion.....	67
4.1	Die Wertigkeit des Kryoschnitt-Assays zur Untersuchung der Pathomechanismen beim BP und bei der EBA.....	68
4.2	Ausmaß der dermo-epidermalen Spaltbildung in Abhängigkeit von der verwendeten Leukozytensubpopulation im Kryoschnitt-Assay.....	70
4.3	ROS-Assay und die Bedeutung der ROS-Freisetzung aus aktivierten Monozyten.....	72
4.4	Zytokin-Assay und die Bedeutung der Zytokin-Freisetzung aus aktivierten Monozyten – ein exploratives Experiment.....	73
4.5	Ausblick.....	74
5	Zusammenfassung.....	76
6	Literaturverzeichnis.....	78
7	Anhang.....	89
8	Danksagung.....	94
9	Curriculum Vitae.....	95

1 Einleitung

1.1 Blasenbildende Autoimmundermatosen

Das gesunde Immunsystem erkennt und eliminiert fremde Antigene und schützt so die Integrität des Organismus. Autoimmunerkrankungen sind durch das Vorhandensein autoantigenspezifischer T- bzw. B-Lymphozyten charakterisiert, die sich im weiteren Verlauf zu autoreaktiven Effektorzellen differenzieren und den eigenen Organismus angreifen.^{1, 2} Unter dem Begriff blasenbildende Autoimmundermatosen wird eine heterogene Gruppe von chronisch verlaufenden und potentiell lebensbedrohlichen Hauterkrankungen zusammengefasst, deren Primäreffloreszenzen Blasen an Haut und/oder Schleimhäuten sind, die immunpathologisch durch Autoantikörper gegen hauteigene Strukturproteine verursacht werden.^{3, 4} Tabelle 1 fasst die heterogene Gruppe der blasenbildenden Autoimmundermatosen mit ihren Autoantikörpern und spezifischen Autoantigenen zusammen.

Grundlegend unterscheidet man innerhalb der bullösen Autoimmundermatosen zwei Hauptgruppen mit einer Vielzahl von Subtypen, deren exakte Diagnose sowohl auf dem klinischen Bild als auch auf dem Nachweis gewebegebundener sowie zirkulierender spezifischer Autoantikörper basiert.^{5, 6} In der Gruppe der **Pemphiguserkrankungen** richten sich die Autoantikörper gegen desmosomale Proteine und es kommt zum intraepidermalen Verlust des Zellkontakts mit intraepidermaler Blasenbildung. Aufgrund ihres dünnen Blasendachs, stellen sich die Blasen klinisch schlaff dar und zerreißen leicht, sodass man häufig anstatt der Blasen bereits Erosionen vorfindet.^{3, 7-9}

Erkrankung	Spaltbildungs- ebene	Direkte Immunfluoreszenz	Indirekte Immunfluoreszenz	Zielantigene
• Pemphigus- Erkrankungen	intraepidermal		interzellulär IgG (Affenösophagus)	
▪ <i>Pemphigus vulgaris</i>	“	<i>interzellulär IgG, C3</i>	“	<i>Dsg 3 und 1</i>
▪ <i>Pemphigus foliaceus</i>	“	<i>interzellulär IgG, C3</i>	“	<i>Dsg 1</i>
▪ <i>Paraneopl. Pemphigus</i>	“	<i>interzellulär IgG, C3</i>	“	<i>Plakine, Dsg 3 und Dsg 1</i>
▪ <i>IgA-Pemphigus</i>	“	<i>interzellulär IgA, C3</i>	<i>interzellulär IgA</i>	<i>Dsc 1, Dsg 3</i>
• Pemphigoid- Erkrankungen	subepidermal		(auf SSS)	
▪ <i>Bullöses Pemphigoid</i>	<i>junktional</i>	<i>linear C3, IgG</i>	<i>IgG Blasendach</i>	<i>BP180, BP230</i>
▪ <i>Pemphigoid gestationis</i>	<i>junktional</i>	<i>linear C3, IgG</i>	<i>IgG Blasendach</i>	<i>BP180, BP230</i>
▪ <i>Schleimhautpemphigoid</i>	<i>junktional</i>	<i>linear IgG, C3, IgA</i>	<i>IgG, IgA Blasendach</i>	<i>BP180, Laminin 5</i>
▪ <i>Lineare IgA-Dermatose</i>	<i>junktional</i>	<i>linear IgA und C3</i>	<i>IgA Blasendach</i>	<i>LAD-1, BP180</i>
▪ <i>Anti-p200-Pemphigoid</i>	<i>junktional</i>	<i>linear IgG und C3</i>	<i>IgG Blasenboden</i>	<i>p200</i>
• <i>Epidermolysis bullosa acquisita</i>	<i>dermal</i>	<i>linear IgG, IgA, C3</i>	<i>IgG, IgA Blasenboden (SSS)</i>	<i>Typ VII- Kollagen</i>
• <i>Dermatitis herpetiformis Duhring</i>	<i>dermal</i>	<i>granulär IgA papilläre Dermis</i>	<i>IgA Endomysium (Affenösophagus)</i>	<i>Trans- glutaminase</i>
<i>Abkürzungen: SSS: Sodium chloride-split skin (NaCl-separierte Spalthaut); Dsg: Desmoglein; Dsc:Desmocollin; BP180: 180 kDa schweres bullöses Pemphigoid Antigen; BP230: 230 kDa schweres bullöses Pemphigoid Antigen</i>				

Tabelle 1: Übersicht der heterogenen Gruppe der blasenbildenden Autoimmundermatosen ¹⁰

In der Gruppe der **Pemphigoiderkrankungen** erkennen die Autoantikörper hemidesmosomale Strukturproteine und die Spaltbildung verläuft zwischen Epidermis und Dermis mit einer subepidermalen Blasenbildung. Abbildung 1 zeigt ein histologisches Bild der Haut und eine schematische Darstellung der Zielproteine (Autoantigene). Das Blasendach aller subepidermal blasenbildenden Autoimmundermatosen besteht aus der gesamten Epidermis und ist somit dicker als beim Pemphigus, sodass sich die Blasen klinisch meist prall darstellen.^{3, 11-13}

1.2 Das bullöse Pemphigoid (BP)

1.2.1 Epidemiologie

Insgesamt ist in Deutschland bei den bullösen Autoimmundermatosen von 2.000 jährlichen Neuerkrankungen und einer Prävalenz von ca. 12.000 Patienten auszugehen. Das bullöse Pemphigoid (BP) ist die häufigste bullöse Autoimmundermatose in Zentraleuropa mit einer Inzidenz von ca. 13-25 Neuerkrankungen pro 1 Million Einwohner pro Jahr. Interessanterweise hat sich die Inzidenz des BP in den letzten zehn Jahren praktisch verdoppelt.^{3, 15-18} In Großbritannien wurde sogar vor kurzem über eine nochmals doppelt so hohe Inzidenz für das BP berichtet, wobei diese Schätzung aus methodischen Gründen wahrscheinlich etwas zu hoch liegt.¹⁹ Bemerkenswert ist weiterhin, dass das BP bisher die einzige beschriebene Autoimmunerkrankung ist bei der die Inzidenz mit steigendem Alter wächst. Es werden bei über 80-jährigen 150-189 und bei über 90-jährigen sogar fast 400 Neuerkrankungen pro 1 Million Menschen pro Jahr verzeichnet. Der allgemeine Inzidenzanstieg beim BP lässt sich am besten mit der steigenden Lebenserwartung der Allgemeinbevölkerung sowie vor allem mit den verbesserten diagnostischen Möglichkeiten erklären. Das Geschlechterverhältnis ist nahezu ausgeglichen, wobei Frauen etwa 1,2-Mal häufiger vom BP betroffen sind als Männer.^{5, 11, 20-22}

1.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Vereinfacht kann man die Pathogenese des BP in wenige aufeinander folgende Schritte gliedern: (1) Entsprechend dem Grundsatz von Autoimmunerkrankungen steht zu Beginn die Aufdeckung/Identifizierung der verantwortlichen Autoantigene. (2) Ein Toleranzverlust dieser Autoantigene führt in einem Organismus mit intaktem Immunsystem u. a. zur Bildung spezifischer B-Lymphozyten, die sich in Anwesenheit von T-Lymphozyten zu Plasmazellen differenzieren und Autoantikörpern gegen die Autoantigene synthetisieren.²³ (3) In der Effektorphase der Erkrankung führen die pathogenen Autoantikörper in Anwesenheit aktivierter Leukozyten zu einer Entzündungsreaktion und schließlich zur Blasenbildung.²⁴ Ein schematischer Ablauf der Pathogenese und wichtige Autoantigene sind in Abbildung 2 dargestellt.

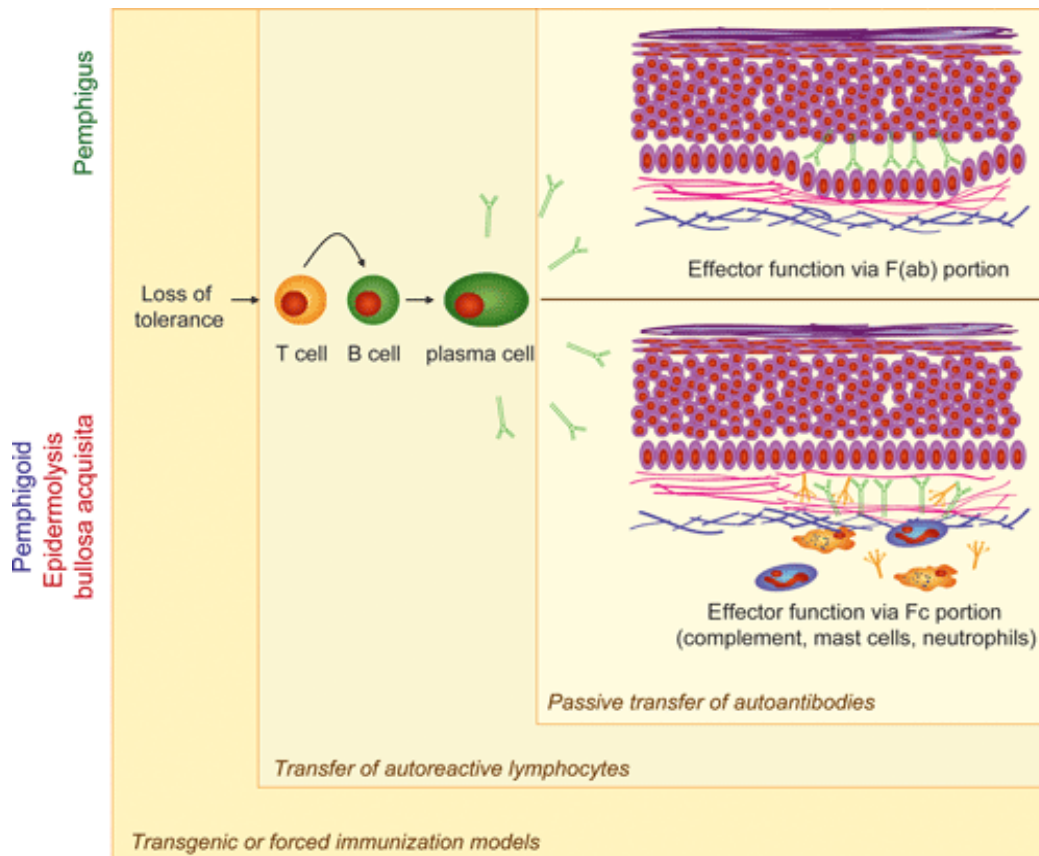


Abbildung 2: Vereinfachter Ablauf der Pathogenese blasenbildender Autoimmundermatosen.

Sowohl bei Pemphigus- als auch bei Pemphigoiderkrankungen kommt es zunächst zu einem Toleranzverlust gegen bestimmte Strukturproteine der Haut (siehe auch Tabelle 1 auf Seite 7). Dies hat eine T-Zell abhängige Bildung von Autoantikörpern zur Folge, die an ihr jeweiliges Zielantigen/Zielantigene binden. Bei Pemphiguserkrankungen sind die Zielantigene in der Epidermis lokalisiert und die Bindung der Autoantikörper führt direkt zur Blasenbildung. Bei Pemphigoiderkrankungen kommt es nach Autoantikörperbildung in aller Regel nicht direkt zur Blasenbildung; vielmehr erfolgt über den Fc-Teil eine Aktivierung des Immunsystems, das letztendlich zur Blasenbildung beiträgt. In transgenen oder Immunisierungs-induzierten Modellen können alle bisher bekannten Schritte der Pathogenese abgebildet werden. In Lymphozyten-transfer Modellen können Mechanismen, die zur Autoantikörperproduktion führen, untersucht werden, während in Antikörpertransfer Modellen die Effektorphase der Erkrankungen dargestellt wird.²⁴

(1) Identifikation der Autoantigene

Der Zusammenhalt zwischen Epidermis und Dermis wird über die dermo-epidermale Junctionszone (DEJ) vermittelt, die aus einem Netzwerk miteinander interagierender Strukturproteine besteht, die das Zytoskelett der basalen Keratinozyten mit Verankerungsfibrillen der papillären Dermis verbinden. Das Auftreten von Autoantikörpern gegen unterschiedliche Komponenten der DEJ kann zu einem Verlust ihrer funktionellen Integrität und schließlich zur subepidermalen Blasenbildung führen.²⁵

Pemphigus- und Pemphigoiderkrankungen konnten zum ersten Mal 1953 von Lever differenziert werden. Lever beschrieb beim Pemphigoid eine subepidermale Blasenbildung im Gegensatz zu einer intraepidermalen beim Pemphigus.²⁷ Ein Jahrzehnt später konnte Jordon erstmals beim bullösen Pemphigoid gewebegebundene und zirkulierende Autoantikörper gegen die DEJ nachweisen, die bis heute eine entscheidende Rolle bei der Diagnose spielen.²⁸ Es stellte sich bald heraus, dass die Autoantikörper der blasenbildenden Autoimmundermatosen, anders als bei den meisten Autoimmunerkrankungen, direkt pathogene Wirkung besitzen.^{5, 24, 29} Der nächste entscheidende Schritt in der Aufschlüsselung der Pathogenese des BP gelang 1981 mittels Immunpräzipitation und Westernblot durch die Darstellung der Autoantigene, nämlich des 230kD schweren Proteins BP230 (Synonym: BPAG1) und wenig später des BP180 (Synonyme: BPAG2 oder Typ XVII Kollagen).^{23, 30} BP230 ist ein rein intrazellulärer Bestandteil der hemidesmosomalen Plaques und gehört zur Plakin-Familie. Seine C-terminale Domäne vermittelt die Verknüpfung von Keratinfilamenten mit der Zellmembran, während der N-Terminus wahrscheinlich mit BP180 und der β 4-Kette des α β 4-Integrins interagiert.²⁶ Die Autoantikörper im Serum von BP-Patienten sind gegen unterschiedliche Epitope von BP230 gerichtet, die vor allem im C-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert sind.³¹

BP180 ist ein transmembranöses Glykoprotein bestehend aus ca. 1500 Aminosäuren und einer Typ-II-Orientierung bei der N-Terminus intra- und C-Terminus extrazellulär zu liegen kommen.³² Ultrastrukturell betrachtet überspannt das Protein die ca. 60nm breite Lamina lucida und reicht mit dem C-Terminus in die Lamina densa. Biochemische Analysen zeigen, dass BP180 als Homotrimer vorliegt. Die intrazelluläre Domäne bildet einen globulären Kopf, der zellmembrannahe Anteil der Ektodomäne einen zentralen gestreckten Teil und der C-terminale Anteil der Ektodomäne den flexiblen Schwanz des Moleküls.^{33, 34} BP180 interagiert mit verschiedenen Strukturen. N-terminal ist es mit der hemidesmosomalen Plaque assoziiert und bindet u. a. an die β 4-Kette des α β 4-Integrins.²⁶ Das C-terminale Ende liegt extrazellulär und ragt in die Lamina densa. Diese Ektodomäne, die mit der α 6-Kette des α β 4-Integrins und Laminin 332 interagiert, besteht aus ca. 1000 Aminosäuren und umfasst 15 Kollagen- und 16 Nicht-Kollagendomänen (NC).^{25, 35} Die Kollagendomänen sind typischerweise in jeder 3. Aminosäureposition mit Glycin besetzt und haben einen hohen Prolinanteil.³³ Die extrazelluläre Domäne NC16A (Nicht-

Kollagendomäne Nummer 16A), die sich unmittelbar an die Zellmembran anschließt, wurde als immundominante Domäne des BP180 beim BP identifiziert. Sie umfasst 76 Aminosäuren, wobei innerhalb der N-terminalen 45 Aminosäuren des NC16A vier Epitope lokalisiert sind, mit denen Autoantikörper im Serum von BP-Patienten vorwiegend reagieren.³⁶⁻³⁸ Diese Antikörper gehören v. a. der IgG4 und IgE-Klasse an.³⁹ Etwa 20% der BP-Seren weisen Reaktivität mit intra- und extrazellulären Epitopen außerhalb von BP180 NC16A auf.⁴⁰ So stellt das BP180 eine wichtige strukturelle Verbindung zwischen den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts und den dermalen Kollagenfilamenten her. Eine genetisch fehlende oder veränderte Expression des BP180 führt auf diesem Wege zu einer Auflösung dieser Verknüpfungen und dadurch zur dermo-epidermalen Spaltbildung.

(2) Toleranzverlust der Autoantigene

Eine genetische Assoziation mit mehreren HLA-Typen konnte für den Krankheitsausbruch gezeigt werden.⁴¹ Allerdings steht die Forschung hier noch ganz am Anfang, sodass in diesem Bereich in den nächsten Jahren neue Erkenntnisse zu erwarten sind. Bei der Pathogenese des BP kommt es initial zu einem Toleranzverlust gegen BP180 und/oder BP230. Wie der Toleranzverlust zustande kommt und welche Faktoren eine wichtige Rolle bis zur Antikörperbildung spielen ist bisher wenig erforscht. Ein Modell bei dem man verschiedene Lymphozytenpopulationen in immundefiziente Mäuse einbringt und beobachtet, ob es zur Blasenbildung kommt, konnte beispielhaft bei der EBA zeigen, dass sowohl B-Lymphozyten als auch CD4+ T-Lymphozyten für den Krankheitsausbruch zwingend notwendig sind.⁴² Beim BP ließ sich analog dazu mit einem rekombinanten Protein, das den Hauptanteil der BP180-Ektodomäne umfasst, eine Proliferationsantwort von vor allem CD4+ Zellen der TH2-Subklasse beobachten. Die daraufhin gesteigerte Produktion von IgG4 und IgE wird durch die Aktivierung der TH2-Zytokine IL-4 und IL-13 vermittelt und ist in BP-Läsionen und im Blut von BP-Patienten nachweisbar.^{43, 44}

(3) Die Effektorphase der Erkrankung

Ebenso wie die hereditären Störungen über einen Toleranzverlust der Autoantigene zur Erkrankungsiniziation führen, konnten verschiedene experimentelle Modelle zeigen, dass es auch über Applikation spezifischer Autoantikörper zum Krankheitsausbruch kommen kann. Anders als der Toleranzverlust ist die Effektorphase durch die Autoantikörper-induzierte Entzündung und Blasenbildung gut erforscht.²⁴ Mit Hilfe von Kryoschnitten

gesunder Haut konnte gezeigt werden, dass BP-Autoantikörper bei Anwesenheit von Entzündungszellen eine subepidermale Spaltbildung auslösen können.⁴⁵ Die von den aktivierten Leukozyten freigesetzten Proteasen und radikale Sauerstoffspezies (ROS) werden letztlich für die Blasenbildung verantwortlich gemacht.^{46, 47} Entzündungsmediatoren und Zytokine sind zelluläre Botenstoffe, deren Aufgabe die Immunreaktionen zu modulieren und zu vermitteln ist. In der Blasenflüssigkeit von BP-Patienten wurden deutlich erhöhte Spiegel verschiedener Zytokine nachgewiesen. Interessanterweise korrelieren die Spiegel von TNF α , IL-1 β , IL-8 und IL-5 im Blaseninhalt mit der Krankheitsaktivität der Patienten.^{48, 49} Somit liegt es nahe, dass diese Zytokine eine wichtige Rolle in der Pathogenese des BP besitzen. Zur Klärung der pathogenetischen Bedeutung der Autoantikörper wurde der Einfluss von IgG, das zuvor aus BP-Patientenserum aufgereinigt wurde, auf kultivierten humanen Keratinozyten untersucht. Diese Stimulation mit BP-IgGs führte bei den Keratinozyten zur Freisetzung großer Mengen von IL-6 und IL-8. Es konnte dann belegt werden, dass dieser Effekt durch Autoantikörper gegen die N-terminalen 30 Aminosäuren der BP180 NC16A-Domäne vermittelt wird.^{32, 50} Die funktionelle Bedeutung der erhöhten Zytokinspiegel muss jedoch in entsprechenden Experimenten klarer charakterisiert werden, da zum Beispiel IL-6 bei der experimentellen EBA, einer weiteren subepidermalen blasenbildenden Autoimmundermatose, unerwartet sogar anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt.⁵¹

Weitere wichtige Informationen zur Pathogenese des BP wurden durch den passiven Transfer der Autoantikörper in neonatale Mäuse aufgeschlüsselt.⁵² Weil die der NC16A-Domäne entsprechende Region auf BP180 von Mäusen zwar eine hohe Sequenzdivergenz zum humanen BP180 aufweist, jedoch nicht mit dieser kreuzreagiert, können humane Antikörper an diesen Abschnitt des murinen BP180 nicht binden. Darum werden Kaninchen mit einem rekombinanten Fragment des murinen BP180 immunisiert und das hieraus gewonnene Kaninchen-anti-Maus BP180 IgG daraufhin intradermal oder intraperitoneal in neonatale Mäuse injiziert. So kommt es zum Ausbruch einer BP gleichzusetzenden Erkrankung. Diese Ergebnisse belegten die pathogenetische Bedeutung der BP180-Autoantikörper. Weitere Untersuchungen zeigten, dass Komplementaktivierung, die Infiltration mit neutrophilen Granulozyten und die Freisetzung von Proteasen am Ort der Spaltbildung wichtige Voraussetzungen für die Auslösung des BP in diesem Modell darstellen.⁵³

Die herausragende Rolle von neutrophilen Granulozyten in der Pathogenese des BP konnte in Mausmodellen in vivo gezeigt werden.⁵⁴ Die Aktivierung von Neutrophilen, die als obligatorische Bedingung für den Ausbruch der Krankheit gilt, resultiert aus der Bindung von Fcγ-Rezeptoren mit Immunkomplexen.⁵⁵ Dabei unterscheiden sich menschliche Fcγ-Rezeptoren von denen der Mäuse.⁵⁶ Im ex vivo Modell konnte beim humanen BP gezeigt werden, dass für die subepidermale Blasenbildung die Expression von Fcγ-Rezeptoren-IIA und Fcγ-Rezeptoren-IIIB in humanen Neutrophilen unerlässlich sind.⁵⁷

1.2.3 Klinik

Der Begriff Pemphigoid stammt aus dem Griechischen und bedeutet übersetzt eine Form (=eidos) von Blase (=pemphix). Die Blasenbildung tritt beim BP charakteristischerweise generalisiert an der Haut auf und geht meistens mit einem sehr intensiven Pruritus einher. Insgesamt ist das Spektrum der klinischen Manifestationen beim BP, der häufigsten blasenbildenden Autoimmundermatose in Europa und den USA, sehr weit. Das durchschnittliche Alter der Patienten ist mit über 75 Jahren außergewöhnlich hoch im Vergleich mit anderen Autoimmunerkrankungen.^{16, 30}

Beim BP kommt es typischerweise zu einem Prodromalstadium in dem die charakteristischen prallen Blasen fehlen. In diesem nicht-blasenbildenden Stadium ist der quälende Pruritus häufig das einzige Symptom. Durch das Aufkratzen der Haut entstehen oftmals Verkrustungen, Erosionen und ekzematöse Stellen. Diese unspezifischen Hautveränderungen können für Monate der einzige Hinweis auf die Erkrankung bleiben, sodass sich vor allem in diesem Zeitraum die Diagnosefindung als besonders schwierig gestaltet. Der erfahrene Kliniker sollte bei älteren Patienten mit chronischem Pruritus immer nach begleitenden Hautmanifestationen suchen, die den Verdacht auf die Diagnose BP lenken könnten. Dazu gehören v. a. Papulae, Urtikaria, ekzematöse Läsionen sowie Exkorationen und Verkrustungen.^{14, 30} In diesem Zusammenhang werden Sonderformen des BP ohne Blasen beschrieben, die generalisiert oder lokalisiert urtikarielle, pruriginöse und ekzematöse Herde aufweisen.^{58, 59}

Im eigentlich für das BP typischen blasenbildenden Stadium entwickeln sich erbsen- bis haselnussgroße Blasen auf normaler oder erythematöser Haut.⁶⁰ Die Blasen stellen sich

prall dar, da sie ein relativ dickes und widerstandsfähiges Blasendach aus der gesamten Epidermis besitzen. Der Blaseninhalt ist klar oder hämorrhagisch, wenn kleine Kapillaren des oberflächlichen Plexus bei der subepidermalen Spaltbildung angerissen wurden.⁶¹ Das Nikolski-Phänomen ist stets negativ. Die Verteilung am Körper ist meistens symmetrisch. Prädispositionsstellen sind die Oberschenkel, Arme und das Abdomen. Orale Schleimhautbefall wird in ca. 10-20% dokumentiert, während andere Schleimhäute praktisch niemals befallen werden. Die prallen Blasen persistieren häufig mehrere Tage bevor sie reißen und erodierte und verkrustete Areale zurücklassen.^{30, 62} Abbildung 3 zeigt das typische klinische Bild des BP. Der Kliniker sollte immer an BP denken, wenn mehrere der folgenden Aspekte gegeben sind: Blasenbildung bei Patienten im Alter von über 70 Jahren, die keine atrophischen Narben, keinen Schleimhautbefall und keinen Befall von Kopf oder Nacken aufweisen.⁶³

Im Gegensatz zum generalisierten Befall, der als typisch für das BP gilt, wurden auch lokalisierte Formen beschrieben. Die Läsionen entstanden hier an Hautarealen, die zuvor erheblichem Stress ausgesetzt waren (wie z. B. nach Bestrahlung, Operation, Trauma oder Verbrennung).^{30, 64}

Zu beachten ist die Tatsache, dass Patienten, die im Alter von 60 Jahren oder jünger an BP erkranken, ein erhöhtes Malignomrisiko besitzen und somit unbedingt auf eine zugrunde liegende konsumierende Erkrankung gescreent werden sollten.⁶⁵

Außerdem wird seit kurzem über eine Assoziation zwischen dem BP und neurologischen Erkrankungen berichtet. Passend dazu wurde gezeigt, dass das Antigen BP230 auch im zentralen Nervensystem exprimiert wird.⁶⁶⁻⁶⁸



Abbildung 3: BP-Patient: typisches klinisches Bild
 (A) Pralle Blasen und Erosionen (B) Ekzematöse Läsionen und Verkrustungen an Körper und Armen ¹⁴

1.2.4 Diagnostik

Die einzelnen Entitäten der subepidermal blasenbildenden Autoimmundermatosen können anhand ihrer jeweils spezifischen Zielantigene differenziert werden. Neuere Verfahren wie z.B. ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assay) haben die Diagnosestellung deutlich vereinfacht und ermöglichen durch die Bestimmung der Autoantikörperspiegel sogar eine Überwachung des Krankheitsverlaufs.¹²

Das Hauptinstrumentarium der Diagnostik beim BP setzt sich aus dem klinischen Bild, der direkten und indirekten Immunfluoreszenz und den spezifischen ELISA zusammen.¹¹ In Tabelle 2 sind die wichtigsten Diagnosekriterien zusammengefasst.

Erkrankung	Klinik	direkte Immunfluoreszenz	indirekte Immunfluoreszenz	ELISA
Bullöses Pemphigoid	pralle Blasen nicht vornehmlich an Schleimhäuten	IgG, IgE und/oder C3 entlang Basalmembran	IgG am Blasendach (epidermale Seite)	BP180 NC16A
Epidermolysis bullosa acquisita	wie beim BP	wie beim BP	IgG am Blasenboden (dermale Seite)	Typ VII Kollagen NC1

Tabelle 2: Diagnosekriterien beim bullösen Pemphigoid und bei der Epidermolysis bullosa acquisita

Mit Hilfe einer lichtmikroskopischen Untersuchung einer läsionalen Hautprobe eines BP-Patienten erkennt man eine subepidermale Blasenbildung sowie ein meist Eosinophilenreiches inflammatorisches Infiltrat in der Dermis.³⁰ Bis heute ist der diagnostische Goldstandard bullöser Autoimmundermatosen der Nachweis gewebegebundener Autoantikörper mittels direkter Immunfluoreszenz (direkte IF oder DIF) aus periläsionalen Hautbiopsien. Dieser diagnostische Schritt erlaubt gleichzeitig auch die sichere Unterscheidung zwischen den beiden Hauptgruppen der bullösen Autoimmundermatosen (Pemphiguserkrankungen und subepidermal blasenbildende Autoimmundermatosen). Beim BP befinden sich die Antikörperablagerungen entlang der Basalmembran.³

Um die Spezifität der Autoantikörper zu identifizieren sind jedoch weitere serologische Verfahren notwendig. Mittels der indirekten Immunfluoreszenz (indirekte IF oder IIF) können zirkulierende Autoantikörper im Patientenserum nachgewiesen werden. Die Verwendung von SSS (sodium chlorid-split skin; zu Deutsch: Natriumchlorid separierte humane Spalthaut) als Substrat ermöglicht hierbei die Unterscheidung zwischen den verschiedenen subepidermal blasenbildenden Autoimmundermatosen. Dabei gilt hier, dass die IIF auf 1 mol/L NaCl-Lösung gespaltener humaner Haut die sensitivsten Ergebnisse liefert.⁶⁹ Typisch für das BP in der IIF ist, dass die Autoantikörper gegen BP180 (Typ XVII Kollagen) und BP230 an der epidermalen Seite, also am Blasendach, des artifiziellen Spalts binden. Die Krankheitsaktivität korreliert allerdings nicht mit dem in der IIF festgestellten Titer. Dies liegt daran, dass bei der IIF neben anti-BP180 Antikörpern vor allem auch anti-BP230 Antikörper detektiert werden und diese sehr wahrscheinlich nicht im gleichen Maße zur Blasenbildung beitragen.^{70, 71}

Eine weitere spezifische und sensitive Methode zur Detektion zirkulierender Antikörper gegen BP180 und BP230 ist der Nachweis mittels ELISA unter Verwendung der relevanten Zielantigene. Die immundominante Region von BP180 ist die NC16A-Domäne, gegen die bei ca. 85% der BP-Patienten IgG-Autoantikörper gefunden werden.^{72, 73} Interessanterweise besitzt die Mehrheit der BP-Patienten neben IgG- auch IgE-Autoantikörper gegen BP180.³⁹ Von großer praktischer Bedeutung ist, dass die Quantität der Autoantikörper gegen BP180 NC16A mit der Krankheitsaktivität korreliert. Dabei ist wichtig anzumerken, dass nicht die Absolutwerte der Autoantikörper mit der Krankheitsaktivität korrelieren, sondern dass die individuellen Verlaufsspiegel relevant sind. Die entsprechenden ELISA sind daher für die Überwachung des individuellen

Krankheitsverlaufs geeignet und können eine wichtige Hilfestellung für die Dosisanpassung der Immunsuppressiva vor allem nach klinischer Ausheilung der Blasen geben.^{12, 30, 71} Zusammenfassend haben die anti-BP180 ELISA in der Diagnosestellung des BP einen hohen Stellenwert erlangt. Sie bieten eine nicht invasive Möglichkeit sehr spezifisch und sensitiv das BP nachzuweisen und ermöglichen auch die Krankheitsaktivität während der Behandlung zu überwachen.

Zirkulierende Autoantikörper gegen BP230 sind bei ca. 65% der BP-Patienten mittels spezifischer ELISA nachweisbar. Somit ist ihr Nachweis sowohl weniger sensitiv als auch weniger spezifisch für die Diagnose des BP und er korreliert auch nicht mit der Krankheitsaktivität.⁷⁴ Deswegen ist der Einsatz dieses anti-BP230 ELISA nur sinnvoll, wenn bei positiver DIF keine anti-BP180 Antikörper nachgewiesen werden können.³⁰ Durch diese neuen sensitiven Nachweisverfahren ist es heute in bis zu 90% der Fälle möglich das BP bereits serologisch sicher zu diagnostizieren.^{3, 5} In Abbildung 4 ist ein Algorithmus zur Diagnosefindung bei Verdacht auf BP bzw. EBA dargestellt.

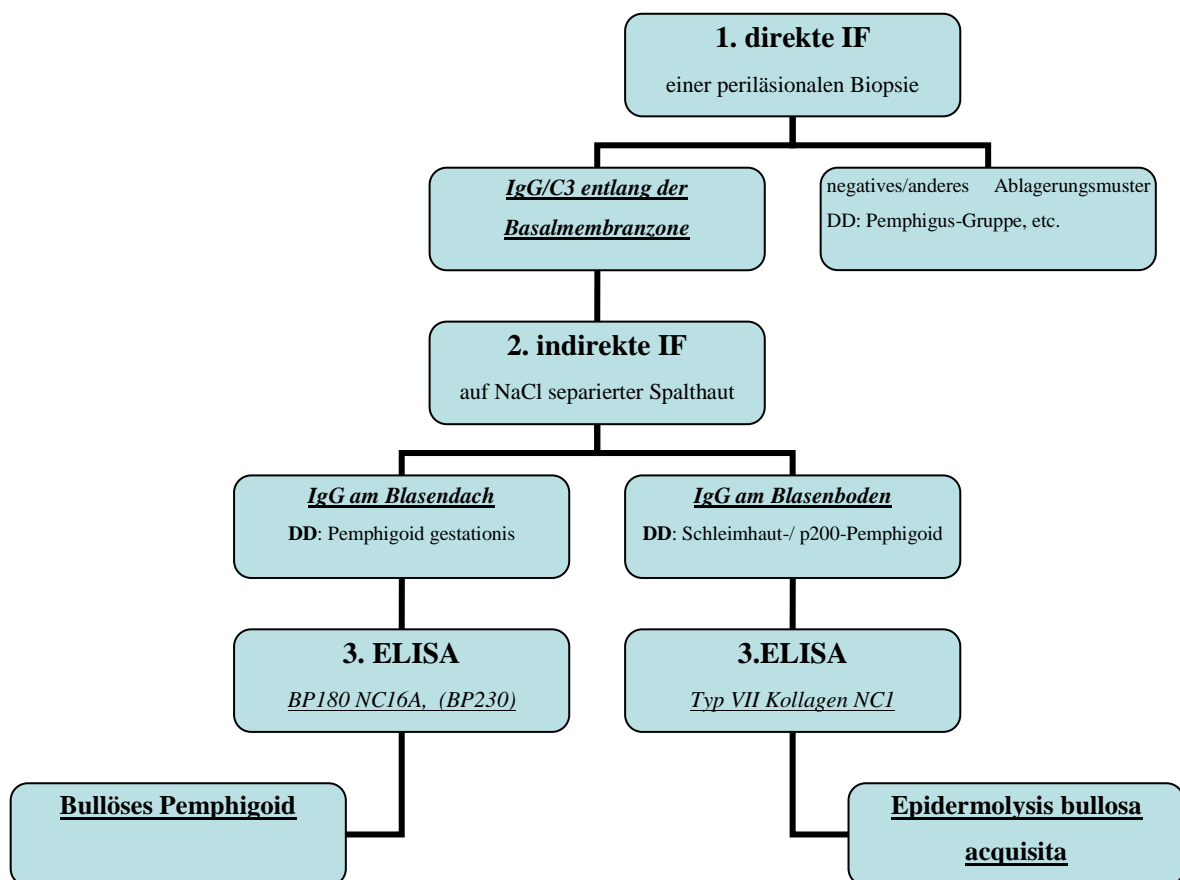


Abbildung 4: Algorithmus zur Diagnosefindung bei Verdacht auf BP bzw. EBA.³⁰

1.2.5 Therapie

Zur Therapie des bullösen Pemphigoids existieren nur wenige kontrollierte Studien, sodass eine evidenzbasierte Therapie nur eingeschränkt möglich ist. In der Regel lässt sich das BP initial gut therapieren. Ziel der Behandlung ist es eine rasche und anhaltende Kontrolle der Erkrankungssymptome bei gleichzeitiger Vermeidung von Nebenwirkungen zu erzielen.⁷⁵ Abbildung 5 zeigt eine Zusammenfassung der Therapiemöglichkeiten beim BP nach heutigem Stand der Wissenschaft.

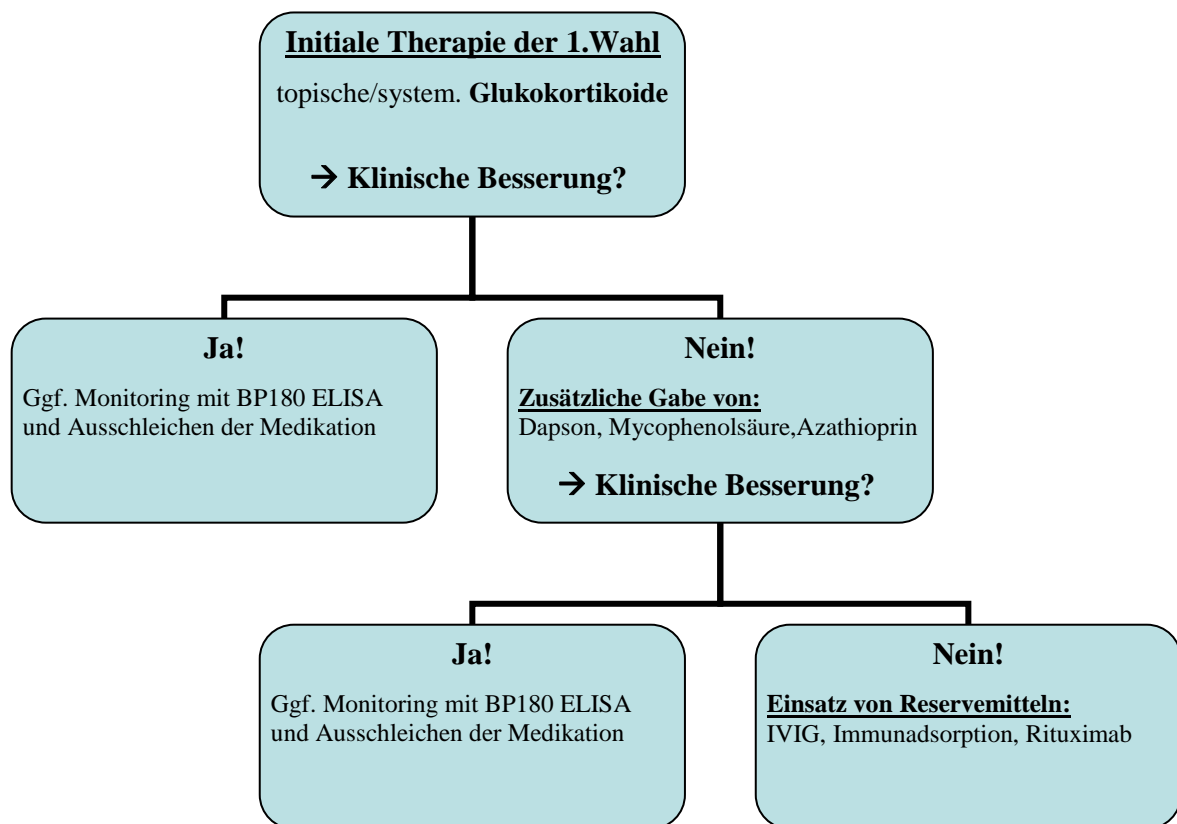


Abbildung 5: Zusammenfassung der Therapiemöglichkeiten beim BP ^{75, 76}

Trotz erheblichem Fortschritt im Verständnis der Pathogenese des BP und großer Fortschritte auf dem Gebiet der immunmodulatorischen Therapie bleiben Glukokortikoide mit ihren zahlreichen Nebenwirkungen nach wie vor Mittel der 1. Wahl in der Therapie des BP.

Laut aktueller Umfragen erfolgt die initiale Behandlung beim BP in Hautkliniken der Bundesrepublik Deutschland in der Regel stationär mit systemischen Glukokortikoiden in

einer Tagesdosis von bis zu maximal 2 mg/kg Körpergewicht Prednisolonäquivalenzdosis.⁷⁵ Nach aktueller Studienlage wird allerdings maximal 0,75 mg/kg Körpergewicht als initiale Dosierung empfohlen. Dies begründet sich damit, dass das BP in der Regel gut auf niedrige Steroiddosen anspricht und so die Nebenwirkungen (wie z. B. Infektionen oder diabetische Stoffwechselstörungen) seltener und in geringerem Maße auftreten.⁷⁶⁻⁷⁸

Eine französische, gut kontrollierte Multicenterstudie konnte die Gleichwertigkeit der topischen gegenüber der systemischen Glukokortikoidtherapie bezüglich der Krankheitskontrolle und Nebenwirkungsrate bei geringerer Mortalität bei moderatem bis hochaktivem BP nachweisen.⁷⁶ Der hohe Evidenzlevel dieser Studie macht die topische Behandlung zur eigentlichen Therapie der 1. Wahl. Gründe für den bislang geringen Einsatz an deutschen Hautkliniken sind der hohe zeitliche Aufwand, die damit verbundene schlechtere Compliance, die höheren Therapiekosten und die Gefahr der Hautatrophie bei langfristiger Anwendung.

Da es bislang keine festen Leitlinien zur Behandlung des BP gibt, erfolgt die Reduktion der Glukokortikosteroide in der Mehrheit der Fälle in Abhängigkeit vom klinischen Verlauf und nicht nach einem festen Schemata.⁷⁵ Hier können die neuen anti-BP180 ELISA eine große Hilfestellung leisten, da die bestimmten Antikörperspiegel mit der Krankheitsaktivität korrelieren.⁷¹ Daher sollten sie vor allem in Stadien, in denen die Klinik rückläufig ist, zur Dosisreduktion herangezogen werden. Durch das Monitoring der Krankheitsaktivität kann mit ihnen ein sicheres und vollständiges Ausschleichen der Glukokortikosteroide erreicht werden und so sowohl Nebenwirkungsraten als auch Rezidivhäufigkeiten gesenkt werden.

Einige Studien haben nachgewiesen, dass die Sterblichkeit beim BP entscheidend von der Art der Therapie beeinflusst wird. So korreliert die Mortalitätsrate in einer deutschen Multicenterstudie mit der Höhe der Glukokortikoiddosierung.⁷⁹ Deswegen werden zusätzlich zu systemischen Glukokortikosteroiden häufig adjuvant Immunsuppressiva wegen ihres steroidsparenden Effektes gegeben.⁸⁰ Das Purin-Analogon Azathioprin, das seit vielen Jahren in der Therapie des BP etabliert ist, wird laut einer Umfrage an deutschen Hautkliniken am häufigsten als adjuvantes Mittel der Wahl herangezogen.

Allerdings konnte ein steroidsparender Effekt von Azathioprin bisher nicht sicher nachgewiesen werden.⁷⁵ Zu beachten ist, dass die Therapie mit Azathioprin die Gefahr einer Myelosuppression birgt und deswegen eine Bestimmung des Enzyms Thiopurinmethyltransferase vor Therapiebeginn erforderlich ist. In einer placebokontrollierten randomisierten Studie konnte vor kurzem ein steroidsparender Effekt für Dapson belegt werden. Die Wirksamkeit und Sicherheit von Dapson in Kombination mit Glukokortikosteroiden beim BP ist seit langem bekannt. Ein weiterer Vorteil vom Immunmodulator Dapson ist der rasche Wirkungseintritt.⁷⁵ Dapson führt zur Unterdrückung der lokalen Entzündungsantwort in der Haut durch Hemmung der Neutrophilenfunktion und auch der Chemotaxis. Vor Beginn der Behandlung mit Dapson muss die Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) bestimmt werden, um einer Dapson-induzierten hämolytischen Anämie vorzubeugen. Ein weiteres beim BP häufig eingesetztes Immunsuppressivum ist Mycophenolsäure. In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass Mycophenolsäure genauso effektiv wie Azathioprin wirkt, aber deutlich weniger hepatotoxisch ist.⁸¹

Bei schweren oder refraktären Verläufen stehen heute einige neue Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung, die in Fallberichten als effektiv beschrieben wurden. Darunter fallen die hoch dosierte intravenöse Immunglobulintherapie (IVIg-Therapie), die Immunadsorption und der monoklonale anti-CD20-Antikörper Rituximab.^{3, 75} Sie sollen im Rahmen der Therapie der Epidermolysis bullosa acquisita näher erläutert werden, da sie bislang nur sehr selten als Therapieoption beim BP zum Einsatz kommen mussten.

1.2.6 Prognose

Das BP verläuft chronisch rezidivierend in Schüben. Älteren Quellen zufolge kann es nach mehrjährigem Verlauf zu spontaner Ausheilung kommen.³⁰ Die Lebensqualität der betroffenen Patienten ist erheblich eingeschränkt und die Mortalität ist im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht. Über die genaue Prognose und Mortalität ist die Literatur bislang uneinheitlich. Die Angaben für die 1-Jahres-Mortalität schwanken zwischen 6% und 39%.^{82, 83} Dies erklärt man sich damit, dass die Prognose entscheidend vom Patientenalter und der Therapie abhängt. Da bislang noch keine festen Leitlinien für die

Therapie existieren, kann man diese Mortalitätsschwankungen teilweise auch auf die unterschiedlichen Therapieansätze zurückführen.³⁰ Zwei große Studien enthüllten folgende Risikofaktoren für eine erhöhte Mortalität im ersten Jahr nach Diagnosestellung: Patientenalter > 80 Jahre, tägliche Prednisolonäquivalenzdosis > 37 mg, Serumalbuminspiegel < 3,6 mg/dL, ESR (Erythrozytensedimentationsrate) > 300 mm/h und ein Karnofsky-Score < 40.^{79, 84, 85}

Wenn ein Malignom bekannt und therapiert ist, sistiert das BP häufig und rezidiert erst bei Tumorprogression erneut.^{84, 85}

1.3 Die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA)

1.3.1 Epidemiologie

Die Inzidenz der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) ist ebenfalls im letzten Jahrzehnt angestiegen und liegt heute bei ca. 0,2 bis 0,5 Neuerkrankungen pro 1 Million Einwohner pro Jahr. Damit gehört die EBA zu seltenen bullösen Autoimmundermatosen. Der Anstieg der Inzidenz ist wahrscheinlich auf die verbesserten diagnostischen Möglichkeiten und eine vollständigere Erfassung von Patienten zurückzuführen.^{6, 11, 20, 86} Von EBA betroffen sind alle Altersgruppen und Rassen. Eine leichte Prädominanz liegt für weibliches Geschlecht und schwarzafrikanische Abstammung vor.^{14, 87}

1.3.2 Ätiologie und Pathogenese

Im Jahre 1971 konnte Roenigk als erster die EBA anhand von klinischen und histologischen Merkmalen von anderen blasenbildenden Autoimmundermatosen unterscheiden.⁸⁸ Eine exakte molekulare Grundlage für die Diagnostik wurde jedoch nicht etabliert, sodass bei vielen der publizierten EBA Fällen die Diagnose nicht immer zweifelsfrei belegt ist. (R. Ludwig, persönliche Mitteilung) Zur besseren Übersichtlichkeit ist die Pathogenese in drei Abschnitte eingeteilt.

(1) Identifikation der Autoantigene und Nachweis der Pathogenität der Autoantikörper

Das Autoantigen der EBA konnte 1988 identifiziert werden. Es handelt sich um das 290kD schwere Typ VII Kollagen (COL7), das den Hauptanteil der Ankerfibrillen bildet und sich in der DEJ befindet.⁸⁹ Die Hauptaufgabe der Ankerfibrillen besteht darin, die Epidermis inklusive ihrer Basalmembran mit der papillären Dermis zu verbinden und zusammenzuhalten. COL7 besteht aus drei identischen α -Ketten, deren 145kD schwere zentrale Kollagendomäne jeweils von einer größeren ebenfalls 145kD schweren N-terminalen Nicht-Kollagendomäne (NC1), sowie der kleineren nur 34kD schweren C-terminalen Nicht-Kollagendomäne (NC2) „umarmt“ wird.⁹⁰ Über die NC2-Domäne verknüpfen sich jeweils die Moleküle zu antiparallelen Dimeren, die über Disulfidbrücken stabilisiert werden und somit zu beiden Enden die NC1-Domänen enthalten.⁹¹ Diese Dimere aggregieren zu überkreuzenden Strukturen, den Ankerfibrillen, die in der Lamina densa lokalisiert sind und sich im Elektronenmikroskop als halbmondförmige Strukturen

darstellen lassen.⁹² Es wurden vier Epitope identifiziert gegen die sich Autoantikörper der meisten EBA-Seren richten und die alle auf der NC1-Domäne lokalisiert sind.^{6, 93}

Zunächst konnte in humanen Kryoschnitten, die mit Autoantikörpern gegen COL7 NC1 von EBA-Patienten und mit Leukozyten gesunder Spender inkubiert wurden, eine subepidermale Spaltbildung hervorgerufen werden. Die autoimmune Natur der EBA und die direkt pathogene Wirkung der Autoantikörper konnte erstmals zweifelsfrei von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen im Jahre 2005 bewiesen werden. Es gelang beiden Arbeitsgruppen nach Kochs Postulat der Autoimmunerkrankungen die EBA in Tieren zu duplizieren.⁹⁴ Im so genannten „passiven“ Modell konnte bei gesunden Mäusen durch die dermale Injektion von humanen aufgereinigten Autoantikörpern bzw. Kaninchen-anti-COL7-Antikörpern, die sich gegen die NC1-Domäne des COL7 richten, eine subepidermale Spaltbildung ausgelöst werden, die mit der EBA gleichzusetzen ist.^{95, 96}

(2) Toleranzverlust der Autoantigene

Die Vorgänge, die zum Toleranzverlust bei der EBA führen sind bislang nur wenig erforscht.⁹⁷ Klinische Beobachtungen, MHC (Major Histocompatibility Complex) Genotypisierungen bei EBA-Patienten und auch Tiermodelle lassen eine genetische Kontrolle des Krankheitsausbruchs vermuten.⁹⁸ In Tabelle 3 sind die bisher erforschten Mechanismen, die zur Autoantikörperbildung bei der EBA führen, zusammengestellt.

Im vor kurzem etablierten „aktiven“ Modell, bei dem die Spaltbildung durch Immunisierung von Mäusen mit einem rekombinanten Fragment der murinen NC1-Domäne (GST-mCol7C) induziert wird,^{2, 99} werden weitere neue genetische Ansätze zur Klärung der Pathogenese der blasenbildenden Autoimmundermatosen erforscht. Der MHC-Komplex, auch bekannt als HLA-Region (human leukocyte antigen region), wurde ursprünglich auf der Oberfläche von Leukozyten identifiziert.¹⁰⁰ Aufgrund seiner zentralen Rolle bei immunologischen Antworten ist der MHC-Komplex einer der am meist erforschten Regionen im menschlichen Genom.¹⁰¹ Es konnte nun gezeigt werden, dass die Auslösung des klinischen Krankheitsbildes der EBA mit dem MHC Haplotyp H2s assoziiert ist, sodass bei anderen Haplotypen die Krankheit trotz Autoantikörper oftmals nicht oder milder ausbricht.⁴¹ In einem Modell mit T-Zell-defizienten Mäusen konnte

gezeigt werden, dass bei ihnen eine Immunisierungs-induzierte EBA nicht auslösbar ist und T-Zellen somit zur Autoantikörperproduktion unabdingbar sind.¹⁰²

Mechanismus	Hinweis für/Assoziation mit
Gene innerhalb des MHC-Komplexes	<ul style="list-style-type: none"> • HLA Haplotypen bei EBA Patienten • MHC Assoziation bei experimenteller EBA
Gene außerhalb des MHC-Komplexes	<ul style="list-style-type: none"> • Überpräsentation schwarzafrikanischer EBA-Patienten • Identifizierung von Quantitativen Trait Loci (QTL) bei experimenteller EBA
CD4+ T-Zellen (Cluster of Differentiation)	<ul style="list-style-type: none"> • T-Zell-defiziente Mäuse sind resistent gegenüber Immunisierungs-induzierter EBA • Nur bei Abwesenheit von CD4+ T-Zellen keine Autoantikörperbildung
HSP90 (heat shock protein)	<ul style="list-style-type: none"> • Blockade von HSP90 verhindert Ausbruch der Immunisierungs-induzierten EBA (über T-Zell Blockade)

Tabelle 3: Mechanismen, die zur Autoantikörperbildung bzw. klinischer Manifestation bei der EBA führen
98, 103

Um die beteiligten T-Zell-Untergruppen zu bestimmen wurde im Rahmen eines anderen Experiments EBA-immunisierten Mäusen CD4+ oder CD8+ T-Zellen über einen gewissen Zeitraum nahezu vollständig depletiert. Bei Depletion von CD8+ T-Zellen konnten unverändert Autoantikörper produziert werden, während es bei Depletion von CD4+ T-Zellen zu einer deutlich verminderten Autoantikörperproduktion kam. Schlussfolgernd kann man sagen, dass CD4+ T-Zellen zur Initiierung der Autoantikörperbildung bei der experimentellen EBA entscheidend mitwirken. Bemerkenswert ist, dass B-Zellen, dendritische Zellen oder Makrophagen unbedingt zur Induktion bzw. Aktivierung der autoreaktiven CD4+ T-Zellen benötigt werden.⁴² In anderen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Blockade von HSP90 vor Immunisierungs-induzierter EBA schützt. Interessanterweise wurde in dieser Versuchsreihe festgestellt, dass hierbei die T-Zell Proliferation signifikant gedrosselt wurde, sodass vermutlich die HSP90 Blockade über die T-Zell Inhibierung wirkt.⁹⁸ Ludwig et al. untersuchten die Mitwirkung genetischer Faktoren außerhalb des MHC-Komplexes in Bezug auf EBA Anfälligkeit und

identifizierten gleich mehrere Quantitative Trait Loci (QTL) auf insgesamt 5 Chromosomen, die einen EBA Ausbruch kontrollieren.¹⁰³ Leider kann man zu diesem Zeitpunkt die EBA noch mit keinem konkreten Gen verknüpfen, aber diese Erkenntnisse ermutigen zur weiteren Erforschung der genetischen Basis, denn aktuell ist noch sehr wenig über die verantwortlichen Gene bei den blasenbildenden Autoimmundermatosen bekannt.

(3) Effektorphase der Erkrankung

Während bereits viele Schritte und Faktoren, die zur Spaltbildung bei der EBA führen, beschrieben worden sind, weiß man noch recht wenig über den genauen zeitlichen Ablauf beginnend bei der Bindung der EBA-Autoantikörper an ihre Autoantigene bis zur Entstehung der Blasenformation. Abstrahiert dargestellt (Abbildung 6) verläuft die Antikörper-induzierte Gewebeschädigung bei der EBA wie folgt: Nach der Autoantikörperbindung in der dermo-epidermalen Junctionszone (DEJ) kommt es zu Komplementaktivierung und Ausschüttung von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen. Über Fc γ -Rezeptoren werden Granulozyten aktiviert, die Matrix-Metallproteasen (MMP) bzw. ROS (reaktive Sauerstoff-Spezies) ausschütten und es letztendlich zu Spaltbildung kommt.⁹⁸

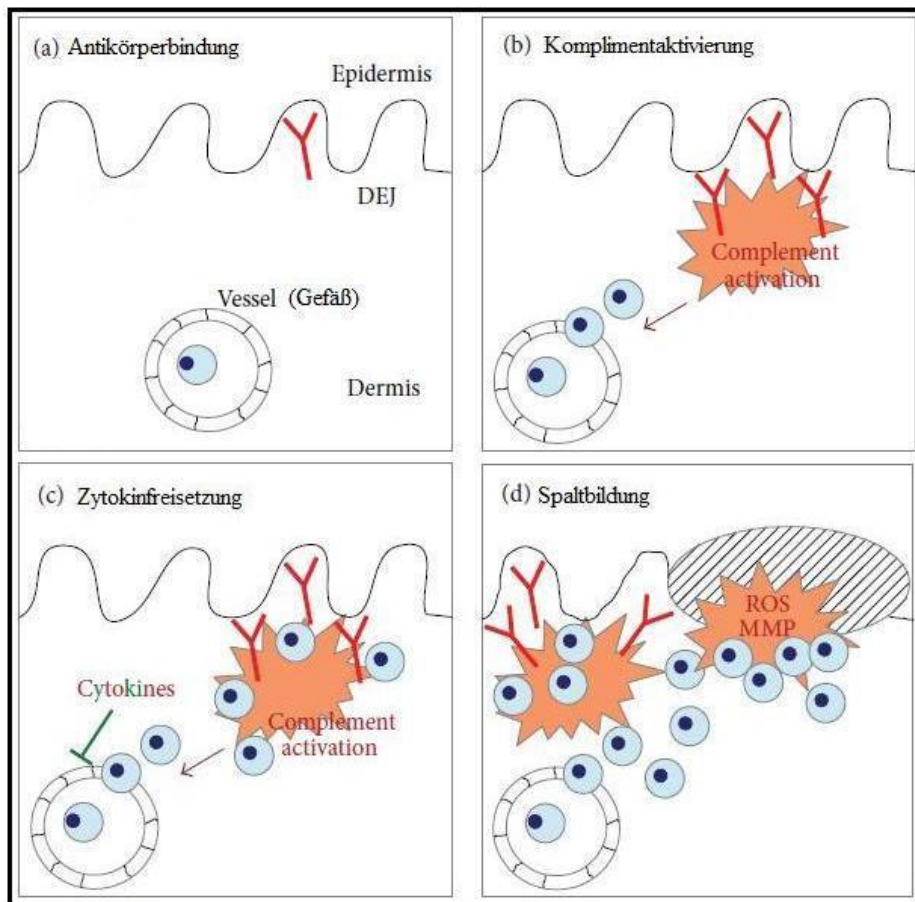


Abbildung 6: Pathogenese der Autoantikörper-induzierten Blasenformation bei der EBA ⁹⁸

Abkürzungen: DEJ: dermo-epidermale Junctionszone, ROS: reaktive Sauerstoffspezies; MMP: Matrix-Metallproteasen

Interessanterweise kontrolliert der neonatale-Fc-Rezeptor (FcRn) die Halbwertszeit der Anti- COL7-Antikörper und seine Blockade führt zu einem gesteigerten Abbau der IgGs.⁹⁸ In humanen Kryoschnitt-Assays konnte nachgewiesen werden, dass die Granulozytenaktivierung über Fc γ -Rezeptoren abläuft und die von ihnen freigesetzten Zytokine unerlässlich für die Spaltbildung sind.^{104, 105} Für die EBA wurden mittlerweile eine ganze Reihe von Zytokinen bzw. Mechanismen entdeckt, die zur Autoantikörper-induzierten Spaltbildung beitragen. Eine Auswahl dieser ist in Tabelle 4 aufgeführt. Dabei spielen v. a. freigesetzte ROS, Gelatinase B und Elastase eine entscheidende Rolle. Allerdings konnte eine ex vivo Blasenformation nur mit IgG1- und IgG3-Sybtypen induziert werden. Weiterhin gilt, dass der Glykosylierungsstatus der IgGs ihre Funktion entscheidend beeinflusst.^{98, 105} Außerdem gelang es bei der experimentellen Spaltbildung der EBA zu zeigen, dass neben der Granulozyteninfiltration auch Komplementaktivierung

stattfindet.¹⁰⁶ Interessanterweise sind EBA-Autoantikörper potentere Komplementaktivatoren als BP-Autoantikörper.¹⁰⁷

Zytokine	Relevanz demonstriert anhand
CXCL1 und 2	Blockade hat präventiven und therapeutischen Charakter bei der experimentellen EBA
GM-CSF	Blockade hat präventiven und therapeutischen Charakter bei der experimentellen EBA
IL-6	Hat anti-inflammatorische Effekte bei der Antikörpertransfer-induzierten EBA
Flii	Überexpression verstärkt und Blockade vermindert die Blasenformation bei der EBA
ROS	Blockade hemmt die Antikörpertransfer-induzierte EBA

Tabelle 4: Auswahl wichtiger Zytokine in der Pathogenese der EBA ⁹⁸

1.3.3 Klinik

Die EBA ist eine chronisch verlaufende bullöse Autoimmundermatose der Haut und Schleimhäute, die vorwiegend Erwachsene, selten auch Kinder betrifft. Das mediane Erkrankungsalter liegt mit 47 Jahren deutlich unter dem des BP und bei der Geschlechterverteilung fällt eine leichte Prädominanz für das weibliche Geschlecht auf.⁹⁸ Das klinische Bild der EBA ist heterogen und kann andere blasenbildende Autoimmundermatosen imitieren. Es lassen sich zwei Haupttypen der EBA identifizieren.^{35, 88} Die häufigere Variante stellt mit ca. 2/3 der Fälle die inflammatorische EBA. Klinisch ähnelt sie häufig entweder dem BP oder dem Schleimhautpemphigoid.¹⁰⁸ Die Patienten haben urtikarielle, erythematöse Plaques mit prallen, teils klaren, teils hämorrhagischen Blasen meistens im Gesäßbereich, in den Axillen und in den Leisten.^{6, 109} Die klassische oder mechano-bullöse Form tritt bei ca. 1/3 der EBA-Patienten auf. Sie ist nicht entzündlich und äußert sich in Hautfragilität sowie prallen Blasen, die unter atrophischen Narben und Milien abheilen. Generell kann zwar jeder Bereich der Haut und Schleimhautoberfläche befallen sein, jedoch tritt sie bevorzugt an mechanisch beanspruchten Körperstellen wie Ellenbogen, Knien und Gesäß sowie an Händen und Füßen auf. Außerdem entsteht postinflammatorisch häufig eine Hyper- bzw. Hypopigmentation der betroffenen Stellen. Nageldystrophien werden ebenfalls häufig beobachtet.^{6, 25} Bei beiden Varianten kann es zu einem Befall der Schleimhäute kommen, am häufigsten der oralen Mukosa, aber auch der Augen und des Ösophagus. Ein

Ösophagusbefall kann durch die Entstehung von Strikturen zu Dysphagie führen und eine endoskopische Intervention notwendig machen.⁹⁸ Über eine Assoziation der EBA mit anderen systemischen Erkrankungen wurde häufig berichtet, am häufigsten mit Morbus Crohn in bis zu 30 % der Fälle,^{110, 111} allerdings beruhen diese Daten auf Beobachtungen vor der Etablierung einer molekularen Diagnostik der EBA.

1.3.4 Diagnostik

Die EBA gehört zu den bullösen Autoimmundermatosen, die klinisch durch Blasen und Erosionen an Haut und/oder Schleimhaut gekennzeichnet sind. Die diagnostische Differenzierung zwischen den einzelnen Entitäten der bullösen Autoimmundermatosen ist für die Therapieentscheidung und Prognose von besonderem Stellenwert und die Inzidenzen haben sich nicht zuletzt wegen der verbesserten diagnostischen Möglichkeiten im letzten Jahrzehnt verdoppelt.⁵ Tabelle 2 (siehe Seite 16) gibt die wichtigsten Diagnosekriterien für die EBA wieder.

Der diagnostische Goldstandard für bullöse Autoimmundermatosen ist der Nachweis von Autoantikörpern in der Haut bzw. Schleimhaut. Dafür wird eine periläsionale Biopsie mittels DIF Mikroskopie beurteilt. Die DIF erlaubt zunächst nur die Differenzierung zwischen Pemphigus- und subepidermalen bullösen Autoimmunerkrankungen.^{3, 5} Das histologische Bild einer läsionalen Hautprobe eines EBA-Patienten zeigt typischerweise eine subepidermale Blasenbildung. Die klassische oder mechano-bullöse EBA präsentiert sich normalerweise mit nicht-inflammatorischen Blasen, während entzündliche EBA-Formen mit einem Neutrophilen-reichen Infiltrat assoziiert sind.^{6, 112} Führt man allerdings die DIF bei hoher Vergrößerung durch, so kann man ein n- oder u-gezahntes Muster der Autoantikörperbindung unterscheiden. Dabei ist das u-gezahnte Muster, das in Abbildung 7 dargestellt ist, pathognomisch für die EBA.⁹⁸ Im nächsten Schritt wird üblicherweise eine IIF auf 1 mol/L NaCl-Lösung separierter humaner Spalthaut durchgeführt. Die IIF ist eine etablierte minimal invasive Methode (serologisches Testsystem) zum Screening auf zirkulierende Autoantikörper bei bullösen Autoimmundermatosen. Sie erlaubt die Unterscheidung, ob vorhandene Autoantikörper am Blasendach oder am Blasenboden des artifiziellen Spalts binden. Im Gegensatz zum BP binden EBA-Autoantikörper, die größtenteils zu den Subklassen IgG1 und IgG4 gehören, typischerweise am Blasenboden,

also an der dermalen Seite der Blase.^{5, 6, 69} In den letzten Jahren wurden zusätzlich serologische Untersuchungen auf Autoantikörper mit Hilfe rekombinanter und zellkultivierter spezifischer Zielantigene entwickelt. Man unterscheidet hierbei die sogenannte ELISA und Westernblot Verfahren.⁵ Bei fast allen EBA-Patienten besteht eine IgG-Reaktivität gegen die NC1-Domäne von Kollagen Typ VII,⁹³ die man deswegen als spezifisches Zielantigene zum Nachweis von Serum-Autoantikörpern bei der EBA nutzt.¹¹³ Somit können ELISA bzw. Westernblot bei begründetem Verdacht durchgeführt werden, um die Diagnose EBA zweifelsfrei zu sichern. In Abbildung 4 (siehe Seite 18) ist ein Algorithmus zur Diagnosefindung bei klinischem Verdacht dargestellt.

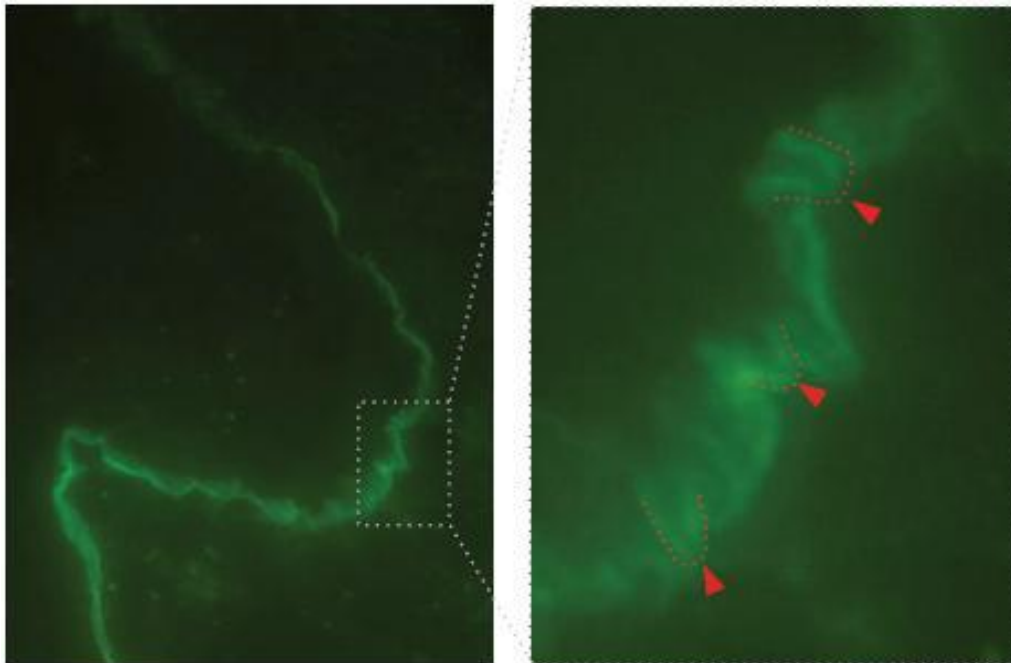


Abbildung 7: Die bei hoher Vergrößerung durchgeführte direkte Immunfluoreszenz Mikroskopie stellt das für die EBA pathognomisch u-gezahnte Muster der Autoantikörperbindung dar⁹⁸

1.3.5 Therapie

Während sich das BP meistens gut therapieren lässt, gestaltet sich die Behandlung der EBA häufig schwierig. Erschwerend kommt hinzu, dass aufgrund geringer Anzahl gut konzipierter prospektiver Therapiestudien keine allgemeingültige Standardtherapie definiert ist. Die initiale Therapie der EBA basiert auf dem Einsatz von Glukokortikoiden bzw. Colchizin in milden Fällen. Allerdings werden die Glukokortikosteroide bei der EBA von Beginn an hoch dosiert und systemisch (1-2 mg/kg KG am Tag) sowie oft von Beginn

an in Kombination mit weiteren Immunsuppressiva wie Colchizin, Azathioprin oder Mycophenolsäure verabreicht. Bis vor kurzer Zeit hatte man bei therapierefraktären Patienten wenige Möglichkeiten zu intervenieren. Heute stehen mit der hoch dosierten intravenösen-Immunglobulin-Therapie (IVIG), der Immunabsorption, der extrakorporalen Photopherese (ECP) und dem CD20-Antikörper Rituximab Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung, die in Fallberichten erfolgreich angewendet wurden.^{3, 4} Abbildung 8 fasst die Therapieoptionen bei der EBA zusammen.

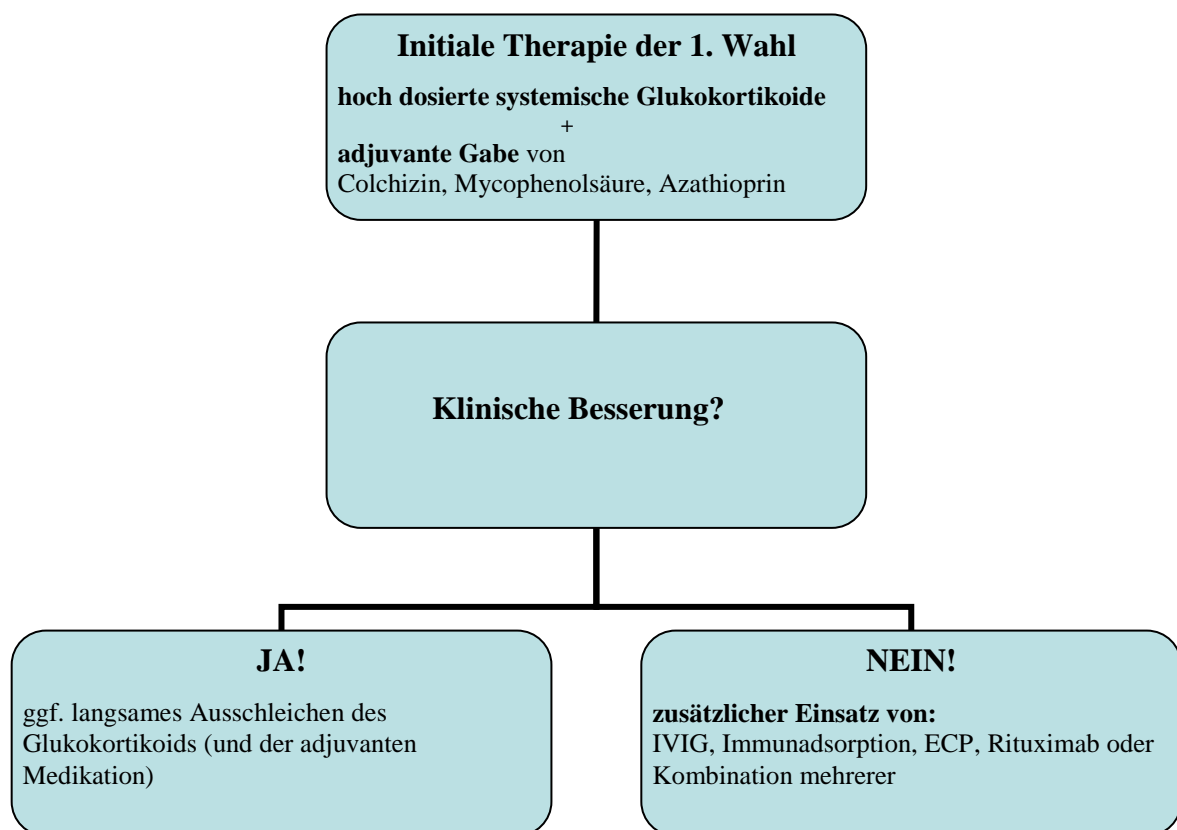


Abbildung 8: Zusammenfassung der Therapieoptionen bei der EBA^{3, 4}

Während die klinische Wirkung der kostenintensiven IVIG zuletzt in einer placebokontrollierten Studie für die Pemphigus-Erkrankung nachgewiesen werden konnte, bleibt ihr genauer Wirkmechanismus weiterhin unklar.¹¹⁴ Eine besondere Rolle scheint dem neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) zuzukommen über den die Halbwertszeit des zirkulierenden IgG und damit auch die Halbwertszeit der pathogenen Autoantikörper reguliert werden. Ein großer Vorteil von IVIG ist das geringe Nebenwirkungsprofil.

Allerdings sollte eine IgA-Defizienz vor der ersten IVIG-Infusion ausgeschlossen werden.^{4, 115} Interessanterweise konnte eine Studie aus Boston, USA, nachweisen, dass die Gesamtkosten der Therapie bullöser Autoimmundermatosen mit IVIG aufgrund der geringeren Rate an unerwünschten Nebenwirkungen sowie kürzerer stationärer Aufenthaltszeiten niedriger sind, als die Kosten einer konventionellen Behandlung.¹¹⁶ Durch eine zusätzliche immunsuppressive Therapie kann die Wirkung weiter erhöht werden.¹¹⁷ Mit der Immunadsorption (Immunophorese) steht ein Verfahren zur Verfügung mit dem man selektiv Immunglobuline aus dem Blut entfernen kann. Nach einmaliger Immunadsorption wird die Autoantikörperlast bereits um bis zu 75 % reduziert.¹¹⁸ Da die pathogenetische Relevanz der Autoantikörper beim BP und der EBA bekannt ist, stellt die Entfernung der pathogenen Autoantikörper eine gute Therapieoption dar.^{4, 71, 95, 96} In Fallberichten konnte gezeigt werden, dass die unmittelbare Reduktion der Autoantikörper durch die Immunadsorption zur raschen klinischen Besserung führt, sodass es nach wenigen Wochen zu einer Abheilung aller Läsionen kommen kann. Eingesetzt wird die Immunadsorption nur adjuvant mit begleitender Immunsuppression, meist bestehend aus Prednisolon plus Azathioprin oder Mycophenolsäure.¹¹⁸⁻¹²⁰ Die extrakorporale Photopherese ist ein weiteres effektives Verfahren bei Therapierefraktärer EBA. Es handelt es sich um eine relativ neue Form der Apherese („Blutwäsche“) und wie die PUVA-Therapie ist auch die extrakorporale Photopherese eine Photoimmuntherapie, bei der eine photosensibilisierende Substanz eingesetzt wird.⁹⁸ Mit Rituximab, einem monoklonalen chimären Antikörper gegen das B-Zell spezifische Oberflächenantigen CD20, existiert ein potentes Second-Line-Therapeutikum zur Behandlung der EBA. Sein Haupteffekt liegt wahrscheinlich in der Entfernung reifer CD20+ B-Zellen für drei bis neuen Monate, die sich also nicht mehr weiter in Autoantikörper-produzierende Plasmazellen differenzieren können.^{3, 121-123} Bei besonders schweren Verläufen oder bei therapierefraktären Patienten können die Immunadsorption und Rituximab auch zusammen eingesetzt werden, um den raschen Wirkungseintritt der Immunadsorption mit der exzellenten Langzeitwirkung von Rituximab zu verbinden.¹²⁴⁻¹²⁶

Um eine weitere Therapieoptimierung bei Patienten mit bullösen Autoimmundermatosen zu erreichen sind prospektive kontrollierte Studien nötig, deren Durchführung aufgrund der geringen Inzidenz erschwert ist. Eine mögliche Alternative ist die Verwendung von

Tiermodellen, in denen unter standardisierten Bedingungen therapeutische Interventionen auf ihre potentielle Wirkung untersucht werden können.

1.3.6 Prognose

Insgesamt ist eine Symptomkontrolle bei EBA-Patienten trotz intensiver Therapie nicht immer zu erreichen, sodass in zwar reduzierter Ausprägung die Hautveränderungen oft weiterhin bestehen bleiben. Zusätzlich zur refraktären Klinik kann es zu Infektionen, Bluthochdruck, Osteoporose, Diabetes Mellitus und vielen anderen unerwünschten Nebenwirkungen aufgrund der hoch dosierten Immunsuppression kommen, sodass die Lebensqualität weiter reduziert wird.⁶

1.4 Ziele dieser Arbeit

Die Ziele dieser Arbeit liegen in der weiteren Aufschlüsselung der Pathogenese der oben beschriebenen Krankheitsbilder: BP und EBA. Diese beiden Entitäten der subepidermal blasenbildenden Autoimmundermatosen unterscheiden sich zwar in ihren spezifischen Autoantigenen, sowie einigen Merkmalen ihrer Klinik und Therapie, jedoch scheinen viele Aspekte der Pathogenese ähnlich zu sein. Bei beiden Erkrankungen spielen direkt pathogene Autoantikörper, die gegen Autoantigene der dermo-epidermalen Junctionszone gerichtet sind, eine entscheidende Rolle in der Pathogenese.^{5, 24, 29} Es konnte für beide Autoimmundermatosen gezeigt werden, dass für die Entstehung der Spaltbildung, neben den gerade genannten direkt pathogenen Autoantikörpern, auch die Anwesenheit von vitalen Leukozyten unerlässlich ist.⁴⁵ Ex vivo und Mausmodelle zeigten, dass für die Krankheitsentstehung aktivierte neutrophile Granulozyten erforderlich sind.^{54, 104, 127} Allerdings konnte aufgrund der Herangehensweise bisheriger Studien nicht geklärt werden, ob aktivierte Granulozyten auch in Abwesenheit anderer Leukozytensubpopulationen eine Spaltausbildung auslösen können. Gleichzeitig stellt sich die Frage, ob andere Leukozytenpopulationen nicht ebenfalls im Stande seien eine dermo-epidermale Separation in Abwesenheit von Granulozyten auszulösen. Um Erkenntnisse zur Beantwortung dieser Fragen zu gewinnen wurde in meiner Arbeit die Bedeutung bzw. der Einfluss humaner Granulozyten, PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell; zu Deutsch: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) und Monozyten jeweils isoliert in der Pathogenese des BP und der EBA mit Hilfe des Kryoschnitt-Assays untersucht. Im Anschluss sollten im Rahmen meiner Arbeit Mediatoren und Botenstoffe identifiziert werden, die die Leukozytenpopulationen im aktivierten Zustand ausschütten, um eine subepidermale Blasenbildung hervorzurufen. Dabei konzentrierte ich mich auf reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowie auf eine Vielzahl von Zytokinen, da bekannt ist, dass sie eine wichtige Rolle in der Pathogenese von bullösen Autoimmundermatosen besitzen.^{48, 49, 54, 128}

Kurz gefasst ist das Ziel meiner Arbeit die Rolle bzw. den Einfluss isolierter Granulozyten, PBMC und Monozyten in der Pathogenese des BP und der EBA anhand von in vitro Modellen näher zu beschreiben und einige der beteiligten zellulären Mechanismen aufzudecken.

2 Material und Methoden

2.1 Ethik-Kommission, Verwendung humaner Biomaterialien (Serum, Zellen, Haut)

Alle Versuche mit humanem Biomaterial (Blut, Serum- und Hautproben) wurden den Spendern nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung entnommen. Die Studien mit den Biomaterialien wurden von der Ethik-Kommission der Universitätsklinik Lübeck geprüft und es wurden keine Bedenken gegenüber der Studien geäußert (AZ: 04-061, 04-144, 05-056 und 09-140).

2.2 Isolierung von peripheren Leukozytenpopulationen

2.2.1 Isolierung von peripheren Gesamtleukozyten mittels Dextran

2.2.1.1 Prinzip der Dextran-Aufreinigung

Beim Dextran handelt es sich um einen Polysaccharid mit dem Erythrozyten aggregieren und dadurch nach unten sedimentieren. So erhält man bereits nach kurzer Inkubation von Vollblut mit einer Dextran-Lösung eine untere Phase mit Erythrozyten und eine obere Phase mit überwiegend Leukozyten (Abbildung 9). Die gewünschte obere Phase mit den Leukozyten wird abgenommen und weiter aufgereinigt.

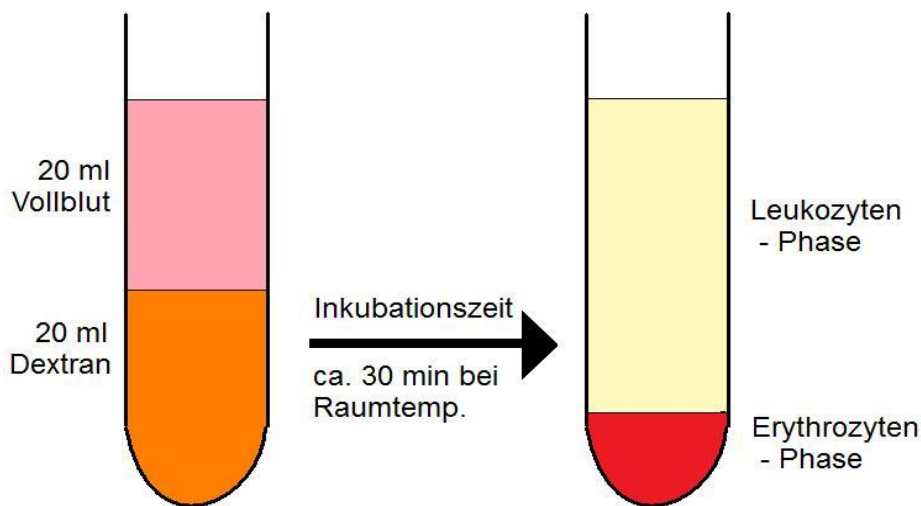


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Dextran-Aufreinigung

2.2.1.2 Durchführung der Isolierung von Gesamtleukozyten mittels Dextran

Für die Isolierung von Leukozyten wurden 80 ml Vollblut verwendet, das gesunden Spendern entnommen wurde. Die Abnahme erfolgte mit einem Perfusionsbesteck (BD Valu-Set) und 20 ml Spritzen (BD Discardit II), die zuvor mit jeweils 1-2 ml Heparin (25000 I.E./ 5 ml) versetzt worden waren. Um die Erythrozyten abzureichern, wurde jede der vier 20 ml Spritzen mit Vollblut zu einem Falcon-Röhrchen gegeben, das zuvor mit jeweils 20 ml NaCl (0,9%)/ Dextran (3%)-Lösung versetzt worden war. Anschließend wurden alle vier Röhrchen für 20-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei bildeten sich zwei Phasen: Während die untere Phase den größten Teil der Erythrozyten

enthielt, befanden sich in der oberen Schicht die Leukozyten. Danach wurde der Überstand mit Hilfe einer 10 ml Pipette auf drei neue Falcon-Röhrchen verteilt, die für 12 Minuten bei 256 g (entspricht 1200 rpm an der verwendeten Zentrifuge) und Raumtemperatur zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und verworfen und die verbliebenen Pellets der drei Falcon-Röhrchen wurden zu 30 ml RPMI-Medium (+ 5 ml L-Glutamin) gegeben und in einem einzigen Falcon-Röhrchen vereinigt. Nach weiterem Zentrifugieren für 12 Minuten bei 256 g und Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen und das Pellet zunächst mit 20 ml kalter 0,9%iger NaCl-Lösung, nach weiteren 20 Sekunden mit 20 ml kalter 1,6%iger NaCl-Lösung resuspendiert und erneut für 12 Minuten bei 256 g und dieses Mal 4 °C zentrifugiert. Nach Absaugen und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet noch einmal mit 30 ml RPMI 1640 Medium (+ 5 ml L-Glutamin) resuspendiert und für 7 Minuten bei 256 g und 4 °C zentrifugiert. Diese Aufreinigungsschritte dienten dazu möglichst alle Erythrozyten aus dem Pellet zu entfernen und so die Reinheit der Leukozytenisolierung zu erhöhen. Abschließend wurde das verbliebene Pellet nach erneutem Absaugen mit 5 ml RPMI (+ 5 ml L-Glutamin) resuspendiert und die gewonnene Zelllösung auf Eis gestellt.

2.2.2 Auftrennung in PBMC und PMN mittels Polymorphprep

2.2.2.1 Prinzip der Auftrennung in verschiedene Leukozytenpopulationen mittels Polymorphprep

Polymorphprep ist eine sterile, Endotoxin-freie, vorgefertigte Lösung zur Isolierung von PMN (Polymorphonuclear Cells; entspricht den Granulozyten) und PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells; entspricht den Monozyten und Lymphozyten). Das Prinzip basiert auf der Polymorphprep-Lösung, die aus Natrium-Metrisoat und einem Polysaccharid besteht. Mittels Zentrifugation lassen sich die Zellpopulationen aufgrund ihrer Dichteunterschiede auftrennen und so werden die mononukleären (PBMC) und polynukleären (PMN) Zellen auf zwei unterschiedliche Banden aufgetrennt, während die Erythrozyten mit dem Polysaccharidbestandteil aggregieren und nach unten sedimentieren (Abbildung 10).

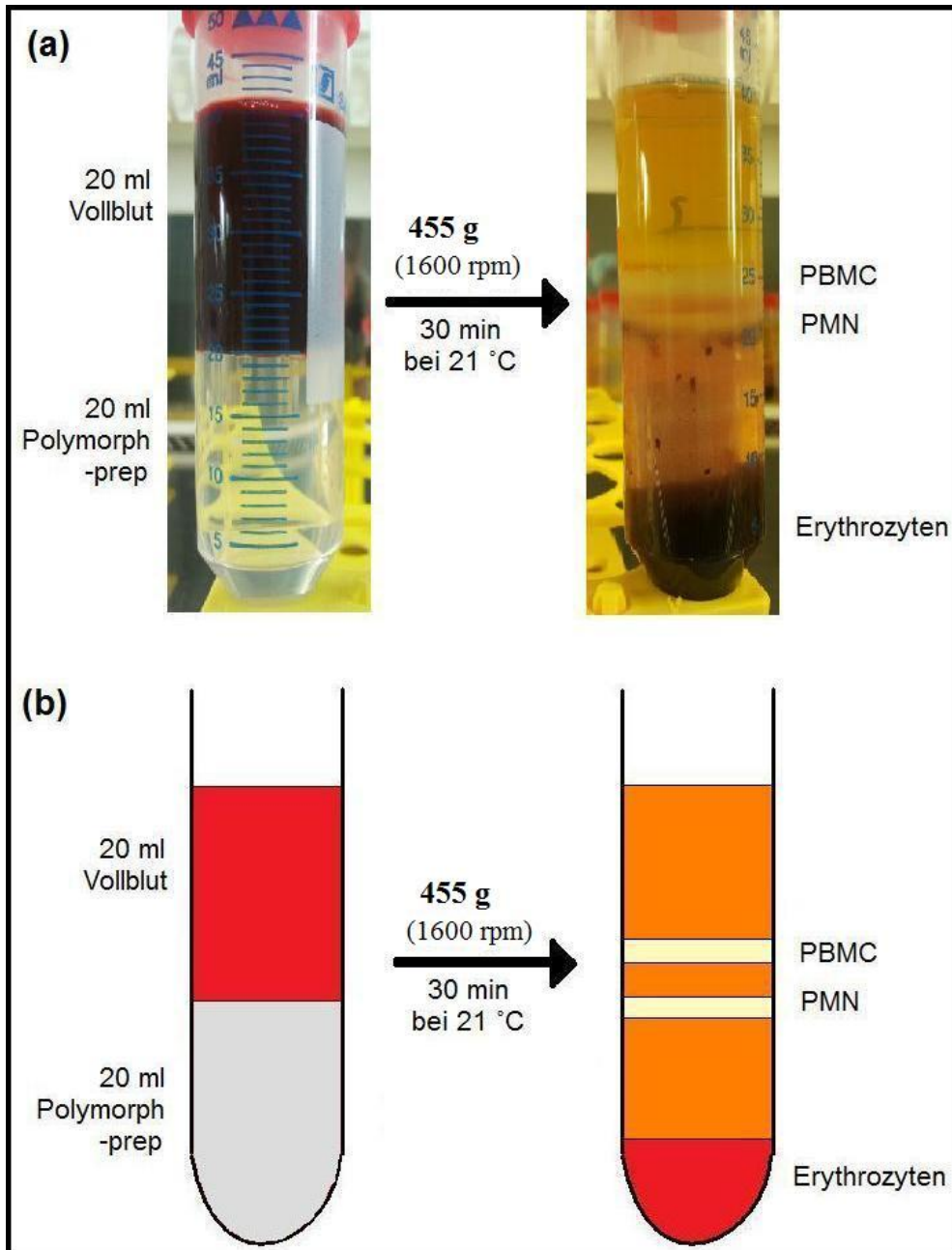


Abbildung 10: Prinzip der Auftrennung in verschiedene Leukozytenpopulationen mittels Polymorphprep
 (a) Originalbilder aus meiner Arbeit und (b) Skizze

2.2.2.2 Durchführung der Auftrennung mittels Polymorphprep

Für die Isolierung von peripheren Leukozyten wurden 80 ml venöses Vollblut gesunder Probanden entnommen. Die Blutabnahme erfolgte mit einem Perfusionsbesteck (BD Valu-Set) und 20 ml Spritzen (BD Discardit II), die mit jeweils 2 ml EDTA (0,5 g / 25 ml) versetzt worden waren. Anschließend wurde das Vollblut in 50 ml Falcon-Röhrchen

umgelagert und die nächsten Arbeitsschritte unter der Sterilbank (Biowizard Kojair) durchgeführt. In vier weitere 50 ml Falcon-Röhrchen wurde jeweils 20 ml Polymorphprep (AXIS-SHIELD) vorgelegt und mit 20 ml des zuvor abgenommenen Vollbluts mit Hilfe einer Pipetierhilfe (Pipetus®-akku) vorsichtig überlagert, sodass sich zwei Phasen, unten Polymorphprep und oben Vollblut, bildeten. Jetzt wurden die Falcon-Röhrchen für 30 Minuten bei 455 g (entspricht 1600 rpm an der verwendeten Zentrifuge) und Raumtemperatur zentrifugiert, wobei zu beachten war, dass die Bremsfunktion der Zentrifuge unbedingt ausgeschaltet werden musste, damit die Zentrifuge sich am Ende langsam ausdrehen konnte um die entstandenen Banden nicht wiederzuvermischen. Die obere Bande bestand aus PBMC (Monozyten und Lymphozyten) und die untere Bande aus PMN (Granulozyten). Jetzt wurden zuerst die oberen Banden aller vier Falcon-Röhrchen mit einer 1 ml Pipette abgenommen und in einem neuen 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und das gleiche Volumen an Halbmedium (RPMI : dest. Wasser [1:1]) dazugegeben und daraufhin mit RPMI auf 50 ml aufgefüllt. Genauso wurde mit der unteren Bande verfahren, sodass man am Ende ein Röhrchen mit PBMC und eins mit PMN hatte. Beide wurden nun für 10 Minuten bei 256 g und Raumtemperatur zentrifugiert und die Überstände abgesaugt und verworfen. Die verbliebenen Pellets enthielten die bereits angestrebten isolierten Leukozytenpopulationen. Um nun die Kontamination mit Erythrozyten weiter zu minimieren wurden die Pellets jeweils mit 5 ml Lysepuffer (D-PBS : dest. Wasser [1:5]) resuspendiert und nach 30 Sekunden Inkubation auf 50 ml mit RPMI aufgefüllt und erneut für 10 Minuten bei 256 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt und verworfen und die Pellets auf 20 ml mit RPMI aufgefüllt und dieses Mal für 10 Minuten bei 256 g und 4 °C zentrifugiert. Abschließend wurden die verbliebenen Pellets nach erneutem Absaugen mit 5 ml RPMI resuspendiert und die gewonnen Zelllösungen auf Eis gestellt.

2.2.3 Isolierung von Monozyten aus PBMC mittels MACS

2.2.3.1 Prinzip der Zellaufreinigung mittels MACS

Das MACS (magnetic cell separation) Prinzip arbeitet mit Hilfe des magnetischen Feldes einer MACS-Separationswand, MACS-Säulen und MACS-Antikörpern, die superparamagnetische Partikel aufweisen, sodass eine magnetische Auftrennung von Antikörper-gebundenen und nicht-gebundenen Zellen stattfinden kann. Die

paramagnetischen Partikel verändern die Funktion der Antikörper oder ihren Funktionsstatus nicht und interagieren für gewöhnlich auch nicht mit anderen Substanzen, sodass markierte Zellen meist problemlos weiter verwendet werden können. Es besteht somit die Möglichkeit markierte und unmarkierte Zellen zu sammeln, also eine positive bzw. negative Selektion durchzuführen. Ziel dieser Arbeit war es Monozyten mit möglichst hoher Reinheit zu isolieren. Dazu wurde eine positive Selektion mit humanen anti-CD14-Antikörpern, die relativ spezifisch für humane Monozyten sind, gewählt, sodass eine hervorragende Reinheit erreicht werden konnte.

Zuerst werden die CD14⁺ Zellen, also Monozyten, mit humanen anti-CD14-Antikörpern magnetisch markiert. Daraufhin werden alle Zellen in die MACS-Säule geladen, die zuvor ins magnetische Feld der MACS-Separationswand gebracht worden ist. Beim Waschvorgang verbleiben nun nur die durch Antikörperbindung magnetisch markierten CD14⁺ Zellen in der Säule, während die nicht-markierten Zellen nach unten durchfließen. Wenn man nun die Säule aus dem magnetischen Feld heraus bringt, kann man die zuvor magnetisch festgehaltenen CD14⁺ Zellen im Sinne positivselektierter Zellen sammeln. Abbildung 11 stellt das MACS-Prinzip schematisch dar.

2.2.3.2 Magnetische Markierung der Monozyten

Nach Isolierung der PBMCs mittels Polymorphprep (siehe 3.1.1) und Bestimmung der Zellzahl (siehe 3.1.3) wurde die Zelllösung auf ein Volumen von 20 ml mit RPMI-Medium aufgefüllt und für 10 Minuten bei 300 g (entspricht 1300 rpm an der verwendeten Zentrifuge) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Nun wurde das Pellet mit 800 µl MACS-Puffer und 200 µl anti-humanen-CD14-Antikörpern resuspendiert, gut geschüttelt und bei 4 °C für 15 Minuten in einen Kühlschrank zur Inkubation gestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden zur Zelllösung weitere 15 ml MACS-Puffer gegeben und für 10 Minuten bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde ein weiteres Mal abgesaugt und verworfen und das Pellet in 500 µl MACS-Puffer gelöst.

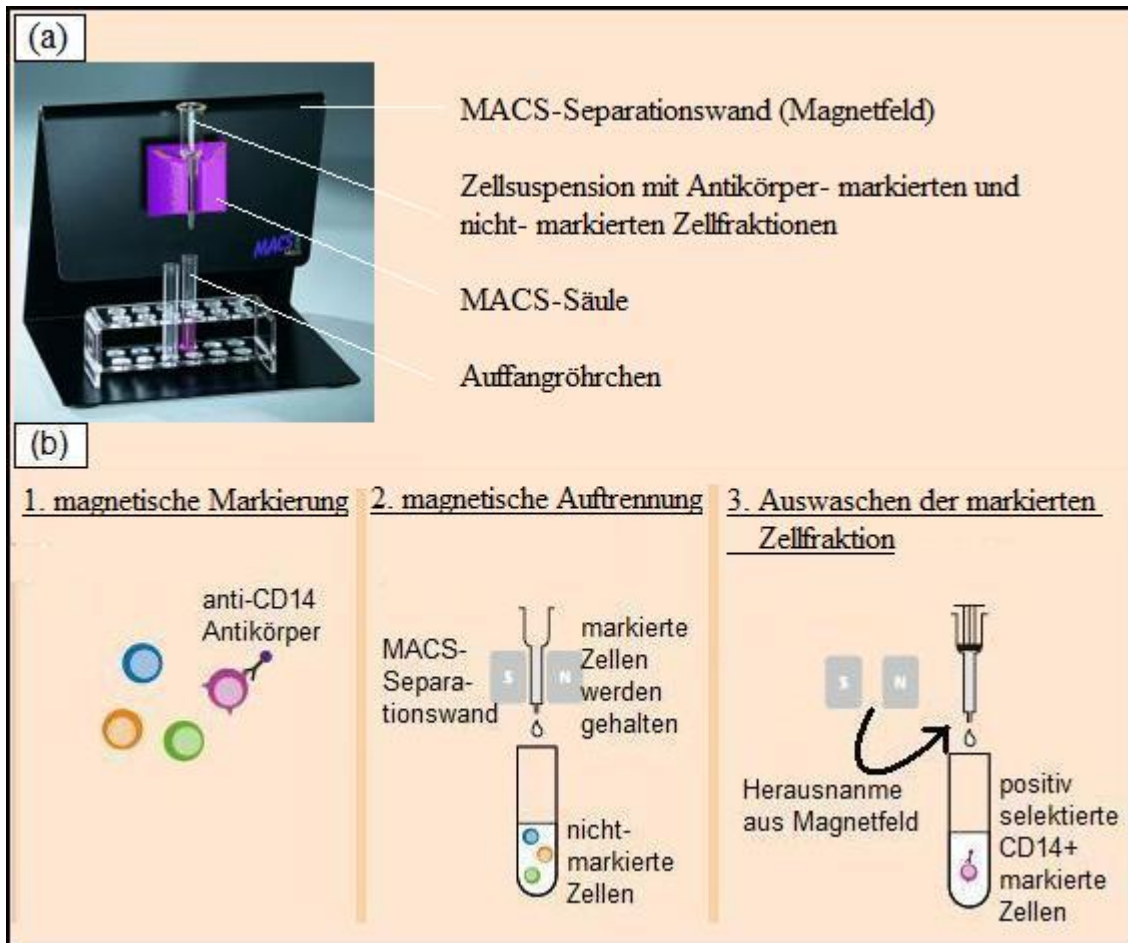


Abbildung 11: Prinzip der Zellaufreinigung mittels MACS

(a) Aufbau und Bestandteile (b) Bei der positiven Selektion werden zunächst (1) die gewünschten Zellen markiert. Hierzu wurden humane-anti-CD14-Antikörper verwendet, die CD14+ Monozyten binden. Daraufhin wird die Zellsuspension ins Magnetfeld der MACS-Separationswand gebracht und gespült, sodass nicht- markierte Zellen in den Auffangbehälter ausgewaschen werden. In der MACS-Säule verbleiben nur die markierten Zellen (positive Selektion; in diesem Fall der Monozyten), die im nächsten Schritt ²³ aus dem Magnetfeld gebracht und erst dann ausgewaschen und gesammelt werden können. (Abb. modifiziert aus www.miltenyibiotec.com vom 08.07.2014)

2.2.3.3 Magnetische Isolierung der Monozyten

Zuerst wurde die MACS-Säule mit Hilfe des passenden MACS-Magneten im magnetischen Feld der MACS-Wand angebracht und mit 500 µl MACS-Puffer gewaschen. Jetzt wurde die zuvor hergestellte Zelllösung mit den markierten Zielzellen in die MACS-Säule pipettiert. Unten wurden die herausfließenden nicht-markierten Zellen gesammelt und verworfen. Um möglichst alle nicht-markierten Zellen herauszuschwemmen wurde die Säule drei Mal mit jeweils 500 µl MACS-Puffer gewaschen. Daraufhin wurde die MACS-

Säule von der MACS-Wand heruntergenommen, also aus dem Magnetfeld gebracht, und über ein sauberes 10 ml Falcon-Röhrchen gestülpt. 1 ml MACS-Puffer wurde in die Säule pipettiert um zügig die markierten Zellen, in diesem Fall Monozyten, mit Hilfe des Druckbolzens im Falcon-Röhrchen zusammen. Abschließend wurde die Zelllösung für 10 Minuten bei 300 g und 4 °C zentrifugiert und die Zellzahl erneut bestimmt (siehe 2.2.4). Die Reinheit der Isolierung der Monozyten wurde mittels FACS (siehe 2.2.5) überprüft und betrug ca. 95%.

2.2.4 Vitalitätsprüfung und Zellzahlbestimmung der isolierten Leukozytenpopulationen

Die Vitalitätsprüfung und Zellzahlbestimmung erfolgte in einem Schritt. Allerdings unterschied sich das Protokoll quantitativ in Abhängigkeit davon, ob der Kryoschnitt-Assay oder ROS-Assay durchgeführt wurde, da bei den Verfahren unterschiedliche Ziel-Zellzahlen festgelegt waren. Im Rahmen des Kryoschnitt-Assays wurden 10 µl der zu prüfenden isolierten Zellsuspension mit 440 µl D-PBS und 50 µl Trypanblaulösung in einem Eppendorfgefäß gemischt. Im Rahmen des ROS-Assays wurden 10 µl der zu prüfenden isolierten Zellsuspension mit 20 µl D-PBS und 20 µl Trypanblaulösung in einem Eppendorfgefäß gemischt. Daraufhin wurden 15 µl der jeweiligen Suspension in eine Neubauerkammer pipettiert und unter 10-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop betrachtet. Bei der Vitalitätsprüfung wurden blau gefärbte Zellen, bei denen der Farbstoff durch die nicht mehr intakte Zellmembran ins Innere der Zellen eingedrungen war, von vitalen farblosen Zellen, bei denen aufgrund der intakten Zellmembran der Farbstoff nicht ins Zytoplasma diffundieren konnte, unterschieden. Die Vitalität der Zellen lag an allen Versuchstagen bei über 95 %.

Die Bestimmung der Zellzahl pro ml erfolgte durch das Auszählen in einer Neubauerkammer. Die Zellzahl lag an allen Versuchstagen zwischen 3,4 und 8,7 x 10⁷ Zellen pro Milliliter. Beim Kryoschnitt-Assay wurde die Zellzahl nach dem ersten Auszählen durch weiteres Verdünnen in RPMI-Medium auf 3 - 5 x 10⁷ Zellen pro Milliliter und für den ROS-Assay auf zwischen 1,1 - 2,7 x 10⁶ korrigiert.

2.2.5 Reinheitsbestimmung der isolierten Leukozytenpopulationen mittels FACS

2.2.5.1 Prinzip des FACS

FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting; zu Deutsch Durchflusszytometrie) ist ein Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNA. Das Prinzip ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezifischen Antikörpern durchgeführt wird. Grundlage ist der Durchfluss einzeln angesaugter Zellen durch einen fokussierten Laserstrahl und die Messung des erzeugten Streu- und Fluoreszenzlichts, wobei die Menge des gestreuten Lichts mit der Größe der Zelle und ihrer Granularität korreliert. Weil nur wenige Zellen per se fluoreszierendes Licht emittieren, verwendet man meistens Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden. Diese Antikörper sind meist gegen bestimmte Oberflächenproteine (z.B. Proteine der CD-Klassifizierung; CD = Cluster of Differentiation) gerichtet. Die erhaltenen Messergebnisse werden anschließend mit der Gerätesoftware grafisch dargestellt.

2.2.5.2 Durchführung der Durchflusszytometrie

Nach Isolierung und Zellzahlbestimmung wurden jeweils zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße mit jeweils 500 µl der zu testenden Leukozytenpopulationssuspension in einer Konzentration von ca. 1×10^6 Zellen pro Milliliter für 5 Minuten bei 1600 g (entspricht 3000 rpm an der verwendeten Zentrifuge) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und zu jedem Reaktionsgefäß wurde jeweils 1 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer gegeben und für 10 Minuten inkubiert. Danach wurde erneut für 5 Minuten bei 1600 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und zu jedem Reaktionsgefäß 100 µl FACS-Puffer gegeben. Nun wurde zu jeweils einer der Proben jeder Leukozytenpopulation 1 µl CD11b-Antikörper pipettiert und die Leukozytensuspensionen für 30 Minuten auf Eis gestellt. Abschließend wurde zu jeder Probe 1 ml FACS-Puffer gegeben, für 5 Minuten bei 1600 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und jeweils 500 µl FACS-Puffer hinzu gegeben und mit der Messung begonnen. Die Messwerte wurden mit der Gerätesoftware grafisch dargestellt und die Reinheit der Leukozytenpopulationen in Prozent berechnet.

2.3 Kryoschnitt-Assay

2.3.1 Prinzip des Kryoschnitt-Assays

Der Kryoschnitt-Assay ist eine *in vitro* Methode mit der man eine subepidermale Blasenbildung *ex vivo* abbilden und somit Aspekte der Pathogenese subepidermal blasenbildender Erkrankungen untersuchen kann. Vereinfacht dargestellt basiert das Prinzip des Kryoschnitt-Assays auf folgenden Schritten (Abbildung 12): Man nimmt Kryoschnitte gesunder humaner Haut und inkubiert diese mit Antikörper-haltigen BP- bzw. EBA-Serum, sodass man Hautschnitte erhält, die nun die pathogenen Antikörper enthalten, die an der DEJ gebunden sind. Nun benötigt man Leukozyten gesunder Spender, die durch die Antigen-Antikörperkomplexe aktiviert werden und durch Ausschüttung von Zytokinen, ROS und MMPs letztendlich die Spaltbildung auslösen. Abschließend werden die Hautschnitte mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) gefärbt und die erzeugte dermo-epidermale Separation mikroskopisch ausgewertet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Leukozytenpopulationen die Entstehung der subepidermalen Spaltbildung auslösen können. Um diese Frage zu beantworten, wurden die mit BP- bzw. EBA-Seren behandelten Hautschnitten nur mit der jeweiligen zu testenden Leukozytensubpopulation, anstatt mit Gesamtleukozyten, inkubiert. Im einzelnen wurde der Kryoschnitt-Assay mit folgenden Leukozytensubpopulationen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt: PBMC (mononukleäre Leukozyten → Monozyten und Lymphozyten), PMN (polymorphkernige Leukozyten → Granulozyten), verschiedene Konzentrationsgemische aus PMN und PBMC und isolierte Monozyten. Als Positivkontrolle diente bei allen Versuchsreihen die Durchführung mit Gesamtleukozyten.

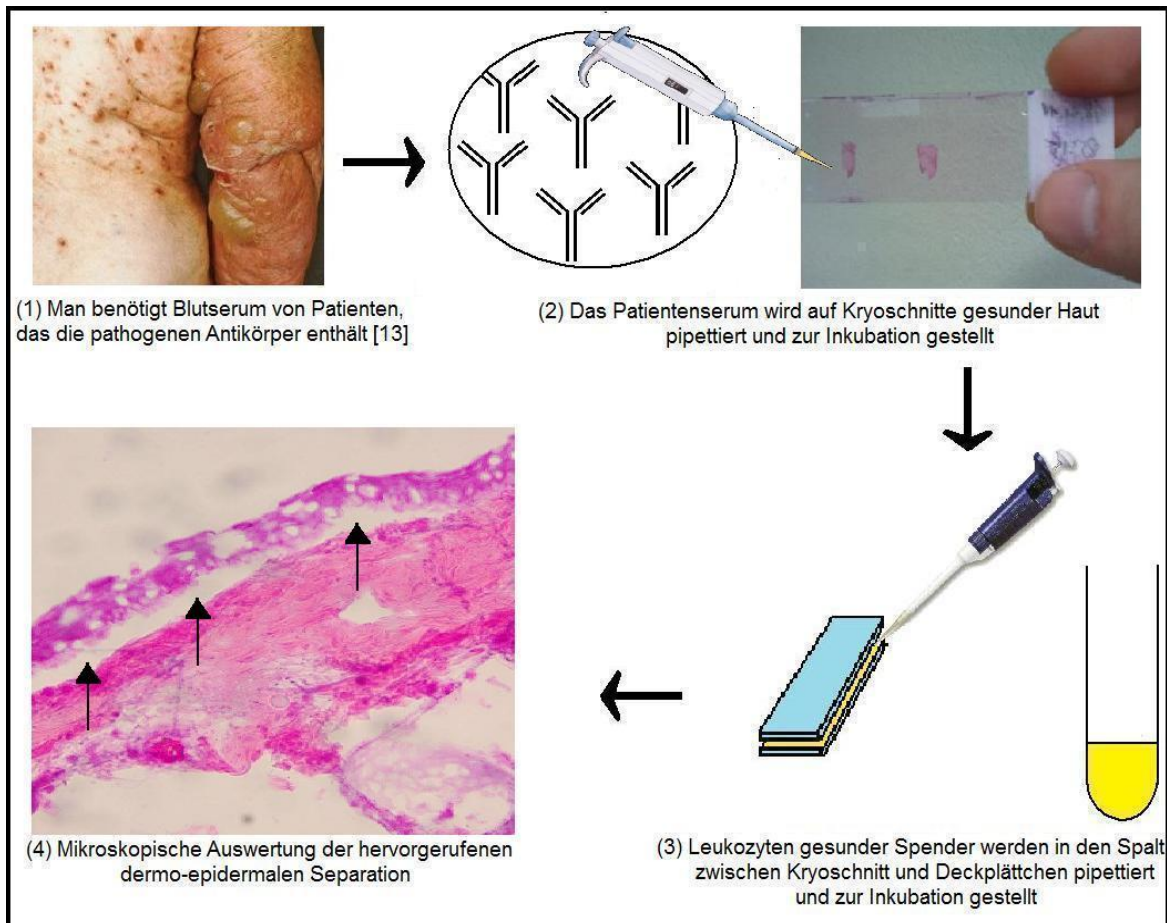


Abbildung 12: Prinzip des Kryoschnitt-Assays

2.3.2 Kontrollseren für den Kryoschnitt-Assay

2.3.2.1 Negativkontrollen

Die Negativkontrollseren wurden von gesunden Spendern gewonnen, die zum Zeitpunkt der Durchführung weder Hinweise auf das Vorliegen einer Autoimmunerkrankung zeigten noch immunsuppressive Medikamente einnahmen. Das Alter der Kontrollpersonen lag zwischen 28 und 45 Jahren. Als Negativkontrollen der verwendeten Kaninchenserum dienten drei Seren gesunder Kaninchen.

2.3.2.2 Positivkontrollen

Verwendet wurden Seren von 30 Patienten mit entweder gesichertem bullösem Pemphigoid (BP) oder gesicherter Epidermolysis bullosa acquisita (EBA). Die Patienten wiesen sowohl

klinische Merkmale der jeweiligen Erkrankung, als auch mindestens eine positive diagnostische Untersuchung (DIF, IIF, ELISA) auf. Die Werte der ELISA mit rekombinantem BP180 NC16A lagen zwischen 148 U/ml und 1546 U/ml. Das Alter lag zwischen 46 und 92 Jahren und es waren 9 männliche und 21 weibliche Patienten vertreten.

Außerdem wurden Seren von 10 mit COL7 immunisierten Kaninchen verwendet, die von einem kommerziellen Anbieter bezogen wurden (Eurogentec, Belgien).

2.3.3 Kryoschnitte

Für die Herstellung der humanen Kälteschnittpräparate wurde neonatale Vorhaut verwendet, die kinderchirurgischen Routineeingriffen entstammt. Die in RPMI-Medium aufbewahrte Haut wurde zunächst in kaltem PBS gewaschen und anschließend in 5x15 mm große Stücke geschnitten und in Tissue-Tek®-O.C.T.-Compound-Medium in einzelnen Plastikschaalen eingebettet. Die eingebettete Haut wurde bei -80 °C aufbewahrt und mit Hilfe des Kryostaten (Leica CM 3000) in 6 µm dicke Schnitte geschnitten. Um eine gute Haftung des Gewebes auf einem Objektträger zu gewährleisten, wurden Super Frost Plus Objektträger verwendet auf denen jeweils zwei Schnitte nebeneinander platziert werden können. Nach Anfertigung der Präparate wurden die Objektträger bei -80 °C in der Gefriertruhe (C660) gelagert.

2.3.4 Durchführung des Kryoschnitt-Assays

2.3.4.1 Isolierung von peripheren Leukozyten

Zu Beginn jedes Versuches wurde festgelegt, welche Leukozytenpopulation getestet und somit isoliert werden sollte. Die Isolation der Leukozyten, Zellzahlbestimmung und Vitalitätsprüfung erfolgte wie in Kapitel 2.2.4 (Seite 42) beschrieben. In dieser Arbeit wurde der Kryoschnitt-Assay mit PBMC, PMN, Mischungen aus PBMC und PMN im Verhältnis von 1:1, 1:2, 1:4 und 1:8, sowie Gesamtleukozyten durchgeführt.

2.3.4.2 Inkubation der Kryoschnitte mit Antigen

In Bezug zu den zu isolierenden Leukozyten wurde ein Plan erstellt, wie viele Hautschnitte am jeweiligen Versuchstag benötigt werden würden. Dabei wurden in dieser Arbeit folgende zwei Varianten durchgeführt: Inkubation von Maushaut mit 20 µl EBA-Kaninchenserum oder Inkubation humaner Hautschnitte mit 50 µl humanem BP- bzw. EBA-Serum pro ein Hautstück. Als Negativkontrollen wurden an allen Versuchstagen Kryoschnitte mit Serum gesunder Probanden bzw. Kaninchen verwendet.

Die Kryoschnitte eines Objektträgers wurden durch eine Linie entlang der Mitte des Objektträgers mittels eines Ölstiftes (DAKO Pen) getrennt, um ein Vermischen der aufzutragenden Seren zu verhindern und mit Datum und Titel beschriftet. Daraufhin wurden die zuvor mit PBS verdünnten BP- bzw. EBA-Seren aufgetragen, wobei die Verdünnung bei 1:4 oder 1:8 lag, je nach dem in welcher Konzentration eine ausgeprägte Spaltbildung auszulösen war. Zur einstündigen Inkubation wurden die Präparate in eine Feuchtigkeitskammer (Werner Hassa GmbH, Hanau) gelegt und bei 37 °C in einen Begasungsbrutschrank (Heraerus Instruments GmbH, Hanau) gestellt.

2.3.4.3 Inkubation der Antigen-haltigen Kryoschnitte mit peripheren Leukozyten

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Hautschnitte für fünf bis zehn Minuten in PBS gelegt und daraufhin mit Objektträgern abgedeckt, die am Rande durch Tesafilmstreifen einige µm erhaben sind, sodass zwischen Kryoschnitt und Deckglas ein schmaler Spalt entsteht. Mit Parafilm wurden die beiden Objektträger aneinander befestigt und in den dazwischen gelegenen Spalt zu jedem Hautschnitt 500 µl der zuvor isolierten Zellsuspension gegeben. Im Rahmen meiner Arbeit wurden nur die zu testenden isolierten Leukozytensubpopulationen zu den Kryoschnitten gegeben, um deren alleinigen Einfluss zu untersuchen. Folgende Populationen wurden getestet: Mischungen aus PBMC und PMN im Verhältnis von 1:1, 1:2, 1:4 und 1:8, isolierte PBMC, isolierte PMN und Gesamtleukozyten. Abschließend wurden die Präparate erneut in die Feuchtigkeitskammer gelegt und dieses Mal für drei Stunden bei 37 °C im Begasungsbrutschrank inkubiert.

2.3.4.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E) und Eindeckung der Präparate

Nach dreistündiger Inkubationszeit wurden die Deckglässchen entfernt und jedes Präparat manuell in PBS gewaschen bis sich der Großteil der Leukozyten aus den Präparaten herauslöste und die dermo-epidermale Junctionszone mikroskopisch gut einsehbar war.

Die Färbung und Eindeckung der Präparate erfolgte in einer bestehenden Färbestraße. Zunächst wurden die Kryoschnitte in Formalin für fünf Minuten fixiert und kurz unter fließendem Leitungswasser abgewaschen. Daraufhin erfolgte eine vierminütige Kernfärbung nach Papanicolaou und erneutes kurzes waschen unter fließendem Leitungswasser. Anschließend wurden die Präparate 20 Sekunden in Essigsäure-Alkohol gelegt, erneut gewaschen und für 10 Sekunden in Ammoniakwasser gestellt und ein weiteres Mal gewaschen. Nun wurden die Präparate für 60 Sekunden mit Eosin gegengefärbt und sofort in der aufsteigenden Alkoholreihe (96, 96, 100%iger Alkohol, Xylol) mit Alkohol und Xylol dehydriert. Abschließend erfolgte das Eindecken der Objektträger mit Deckgläsern mittels eines Deckglasautomaten der Firma Leica CV 5030.

2.3.4.5 Mikroskopische Auswertung der Kryoschnitte

Die mikroskopische Auswertung erfolgte von zwei unabhängigen Personen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. Bewertet wurde die prozentuale dermo-epidermale Separation in Bezug auf die Gesamtlänge der dermo-epidermalen Junctionszone jedes Hautschnittes. Die Ergebnisse wurden in einer Microsoft Excel Tabelle zusammengefasst. Die Bildaufnahmen der mikroskopischen Präparate wurden mittels der Software ProgResCapture 2.1 angefertigt.

2.3.4.6 Statistische Auswertung des Kryoschnitt-Assay

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm SigmaPlot13.0. Da die erhaltenen Daten nicht normalverteilt waren, wurden der Median sowie die 25. und 75. Perzentilen ermittelt und die Ergebnisse anschließend in einem Boxplot-Diagramm veranschaulicht. Der „Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks Test“ wurde verwendet, um die Daten miteinander zu vergleichen. Bei Signifikanz wurde anschließend der „Student-Newman-Keuls Test“ durchgeführt, der die Ergebnisse aller Gruppen miteinander vergleicht.

2.4 ROS-Assay

2.4.1 Prinzip des ROS-Assays

Werden Leukozyten aktiviert, so können sie radikale Sauerstoffspezies (ROS) bilden und ausschütten. Im hier durchgeführten ROS-Assay wird die ROS-Produktion mittels Chemilumineszenz gemessen. Dazu wird eine 96-well ELISA-Platte zuerst mit Antigen und dann mit passendem Antikörper inkubiert, sodass sich Immunkomplexe bilden. Gibt man jetzt Leukozyten dazu, so werden diese durch die Immunkomplexe aktiviert und können ROS produzieren. Um diese freigesetzten ROS im Luminometer (ELISA-Reader) messen zu können, müssen die Zellen in Chemilumineszenz-Medium (CL-Medium) gelöst und Luminol dazugegeben werden (Abbildung 13).

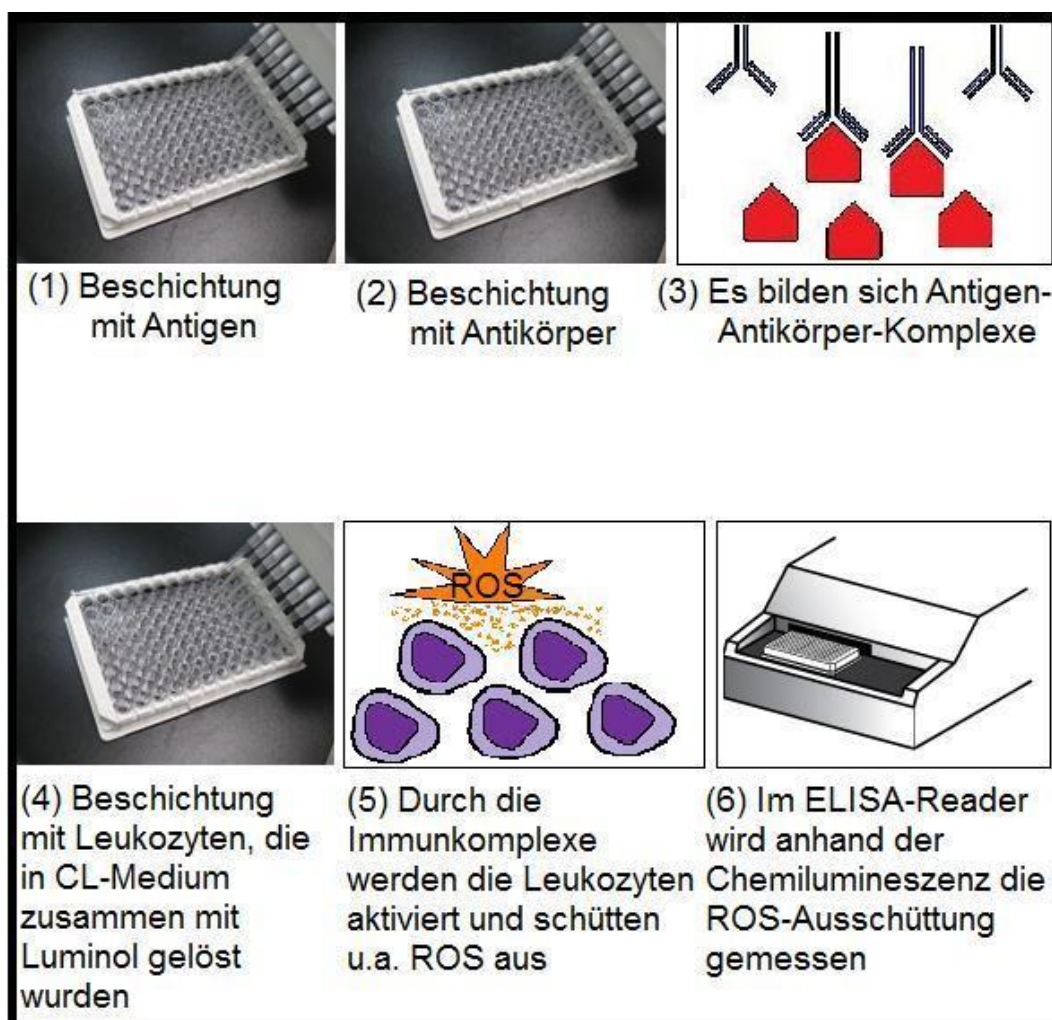


Abbildung 13: Prinzip des ROS-Assays

2.4.2 Durchführung des ROS-Assays

2.4.2.1 Einteilung der ELISA-Platte

Verwendet wurde eine 96 Well-Platte (Nunc F96 Micro Well Plate), die als erstes in sechs verschiedene Bereiche unterteilt wurde. Ein Bereich galt den Positivkontrollen, in der die Leukozyten durch das Vorhandensein von fMLP (formyl-Met-Leu-Pro) aktiviert wurden. Zwei Bereiche nahmen die Negativkontrollen ein, in denen die Leukozyten nicht zu Immunkomplexen, sondern zu nur-Antigen oder nur-Antikörper gegeben wurden. Jeder der zuvor genannten Bereiche erhielt jeweils eine Spalte á fünf Wells. Die restlichen drei Bereiche, für die jeweils drei Spalten á fünf Wells zur Verfügung standen, wurden für die Proben in drei Antikörperverdünnungen (1:1, 1:2, 1:4) verwendet (Abbildung 14).

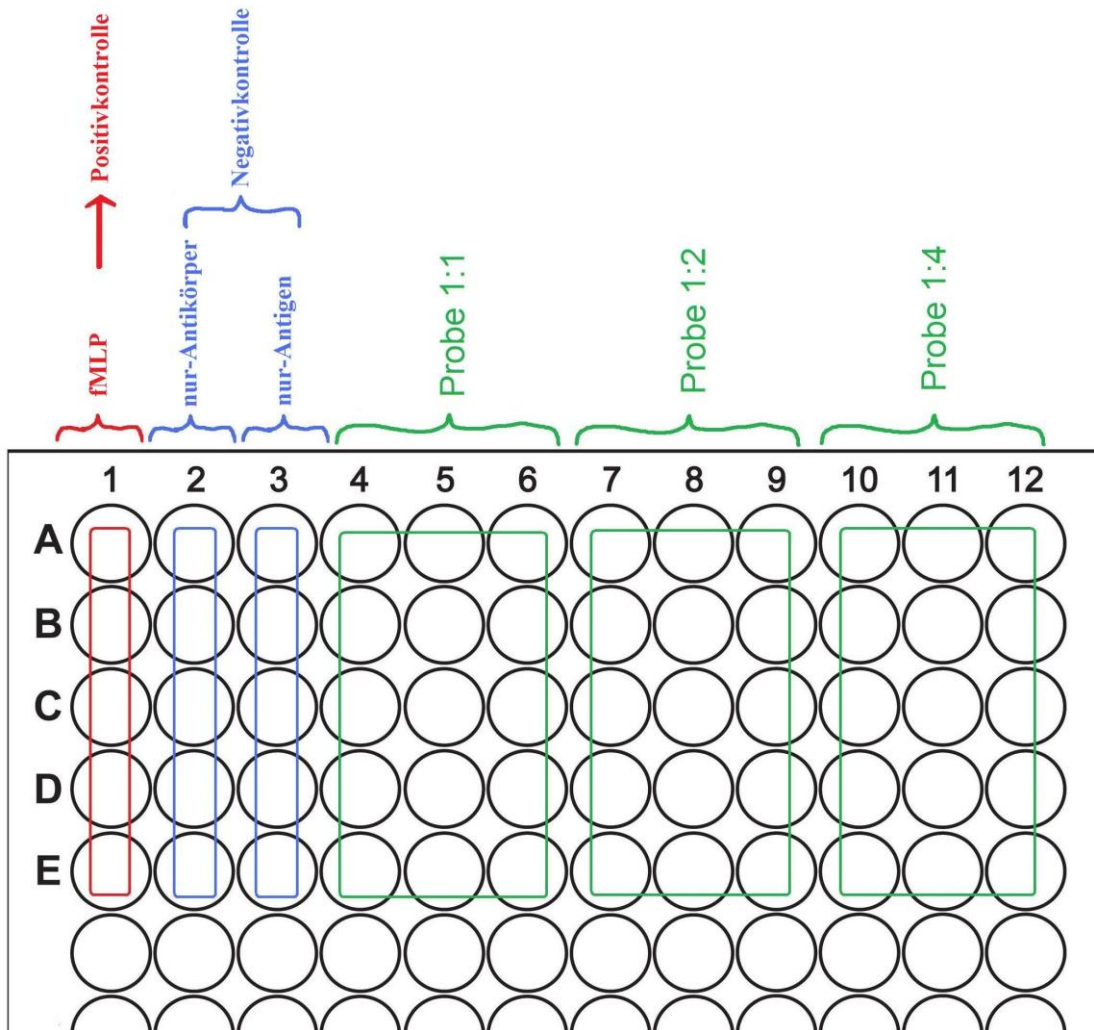


Abbildung 14: Beschichtung der ELISA-Platte im Rahmen meiner Arbeit

2.4.2.2 Beschichtung der ELISA-Platte mit Antigen

115 µl des verwendeten Antigens (hCol7E-F) wurden mit 3885 µl einem zuvor hergestellten Carbonatpuffer gemischt und jeweils 50 µl pro Well in die drei Probeströme und die nur-Antigen-Negativkontrolle mit einer Mehrkanalpipette pipettiert. Daraufhin wurde eine Folie auf die ELISA-Platte geklebt und die Platte für drei Stunden bei Raumtemperatur im ELISA-Schüttler inkubiert. Danach wurde die Folie abgenommen und die Platte im ELISA-Washer mit normalem Waschpuffer gewaschen. Abschließend wurden 100 µl des zuvor hergestellten Blockingpuffers mit einer Mehrkanalpipette in alle 60 verwendeten Wells pipettiert, erneut eine Folie auf die Platte geklebt und sie über Nacht bei 4 °C im Kühlraum schüttelnd inkubiert.

2.4.2.3 Inkubation der ELISA-Platten mit Antikörpern

Am darauf folgenden Tag wurde die ELISA-Platte zunächst im ELISA-Washer gewaschen und 100 µl Antikörpersuspension (humanes aufgereinigtes IgG1 gegen hCol7/EBA¹²⁹) in alle Bereiche, unter Auslassen der Wells für die Positivkontrollen und die nur-Antigen-Negativkontrollen, mit einer Mehrkanalpipette pipettiert. Zuvor mussten noch die verschiedenen Antikörperkonzentrationen hergestellt werden. Dafür wurden 6 µl Antikörper mit 2400 µl Blockingpuffer verdünnt und als Standardkonzentration festgelegt. Entsprechend wurden 2 µl Antikörper mit 1600 µl Blockingpuffer für eine 1:2 Verdünnung und 1 µl mit 1600 µl für eine 1:4 Verdünnung angelegt. Die nur-Antikörper-Negativkontrolle erhielt mit 1:1 die höchste Antikörperkonzentration. Die Platte wurde wieder mit der Folie beklebt und ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur im ELISA-Schüttler inkubiert.

2.4.2.4 Isolierung von peripheren Leukozytenpopulationen

In dieser Arbeit wurde der ROS-Assay zunächst mit PBMCs und anschließend mit isolierten Monozyten durchgeführt. Die Isolierung, Vitalitätsprüfung und Zellzahlbestimmung erfolgte wie in Kapitel 2.2.4 (Seite 42) beschrieben. Für den hier verwendeten ROS-Assay wurden ca. 7 ml Zellsuspension in einer Konzentration von ca. 1×10^6 Zellen benötigt.

2.4.2.5 Zugabe der Leukozyten und Messung der ROS-Produktion

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte zunächst im ELISA-Washer mit Waschpuffer und daraufhin mit 200 µl CL-Medium pro Well gewaschen und ausgeklopft. Von nun an musste sichergestellt werden, dass die folgenden Schritte zügig und ohne Verzögerungen abliefen. Zuerst wurde in alle Wells, unter Auslassen der Positivkontrollen, 100 µl CL-Medium mit einer Mehrkanalpipette pipettiert. Als nächstes wurde in alle Bereiche 100 µl Leukozytensuspension pro Well mit einer Mehrkanalpipette pipettiert. Zuvor musste zu den in 7 ml CL-Medium resuspendierten Leukozyten noch 300 µl Luminollösung gegeben werden. Abschließend wurde zur Positivkontrolle 100 µl der zuvor angefertigten fMLP-Lösung pipettiert und die Platte sofort in den ELISA-Reader gestellt. Die Messung erfolgte im Programm Wallac-1420-Manager im Protokoll Chemilumineszenz-ROS-Release und zwar jeweils 60 Mal pro Well im 60 Sekundentakt.

2.4.2.6 Statistische Auswertung der ROS-Produktion

Die gemessenen Daten aus dem Programm Wallac-1420-Manager lassen sich in Microsoft-Excel importieren. Die statistische Auswertung erfolgte anschließend im Programm SigmaPlot13.0. Da die erhaltenen Daten nicht normalverteilt waren, wurden der Median sowie die 25. und 75. Perzentilen ermittelt und die Ergebnisse anschließend in einem Boxplot-Diagramm veranschaulicht. Der „Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks Test“ wurde verwendet, um die Daten miteinander zu vergleichen. Bei Signifikanz wurde der „Student-Newman-Keuls Test“ durchgeführt, der die Ergebnisse aller Gruppen miteinander vergleicht.

2.4.2.7 Abnahme der Zellüberstände für den Zytokin-Assay

Nachdem die Messung im ELISA-Reader abgeschlossen und der ROS-Assay somit abgeschlossen war, wurden die Zellüberstände für den Zytokin-Assay abgenommen. Zunächst wurde die ELISA-Platte für 10 Minuten bei 455 g und 4 °C zentrifugiert um die Leukozyten im Pellet zu sammeln. Daraufhin wurden mit einer 200 µl Pipette die Überstände ohne Kontamination mit den am Boden befindlichen Leukozyten vorsichtig abgenommen und unter Berücksichtigung der sechs unterschiedlichen Bereiche in jeweils sechs 2 ml Reaktionsgefäßen gesammelt. Diese wurden beschriftet und bei -20 °C im Gefrierfach bis zur weiteren Analyse eingefroren.

2.5 Zytokin-Assay

2.5.1 Prinzip des Zytokin-Assays

Zytokine sind extrazelluläre Signalmoleküle, die von Zellen in Abhängigkeit von der Zellart und ihrem Aktivierungszustand ausgeschüttet werden. In meiner Arbeit wurden Monozyten gesunder Spender mit EBA-Antigen-Antikörperkomplexen aktiviert und nach einer Inkubationszeit die Zellüberstände mit den vermeidlichen Zytokinen abgenommen (siehe 2.4 auf Seite 49). Das hier verwendete „Kit Proteome Profiler, Human Cytokine Array Panel A“ der Firma R&D Systems zur Zytokinmessung basiert vereinfacht auf folgendem Prinzip: Spezifische Antikörper (Capture Antibody) sind in doppelter Ausführung auf Nitrozellulose-Membranen fixiert. Zu ihnen wird der zu testende Zellüberstand, der zuvor mit Detektionsantikörpern (Detection Antibody) resuspendiert wurde, gegeben. So erreicht man, dass die aus Detektionsantikörpern und Zytokinen bestehenden Immunkomplexe von den auf der Membran fixierten Antikörpern gebunden und auf der Membran an fixer Stelle gehalten werden. Gibt man jetzt Streptavidin-HRP und Chemilumineszenz-Detektions-Reagenz (Biotin) auf die Membran, so wird an jedem Punkt Licht in Proportion zur Zytokinmenge produziert, die im Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden kann. In Abbildung 15 sind die 31 Zytokine, die mittels dieses Assays detektiert werden können mit ihrer exakten Lokalisation aufgelistet.

2.5.2 Durchführung des Zytokin-Assays

2.5.2.1 Auswählen der zu testenden Proben

Beim Zytokin-Assay wurden vier Membranen mitgeliefert, sodass als erstes bestimmt werden musste, welche Überstände aus dem ROS-Assay (siehe 2.4 auf Seite 49) zur Verwendung kommen würden. In dieser Arbeit wurden zwei Versuchstage (16.04.12 und 02.05.2012) ausgewählt. Die 1:1 Proben aus dem ROS-Assay hatten durchgehend am meisten ROS produziert und wurden als Testproben für den Zytokin-Assay ausgewählt. Als Negativkontrolle wurden die nur-Antikörper-Negativkontrollen aus dem ROS-Assay genommen, die durchgängig mehr ROS als die nur-Antigen-Negativkontrollen produziert hatten. Es wurden also zwei Proben im Vergleich zu zwei Negativkontrollen getestet.

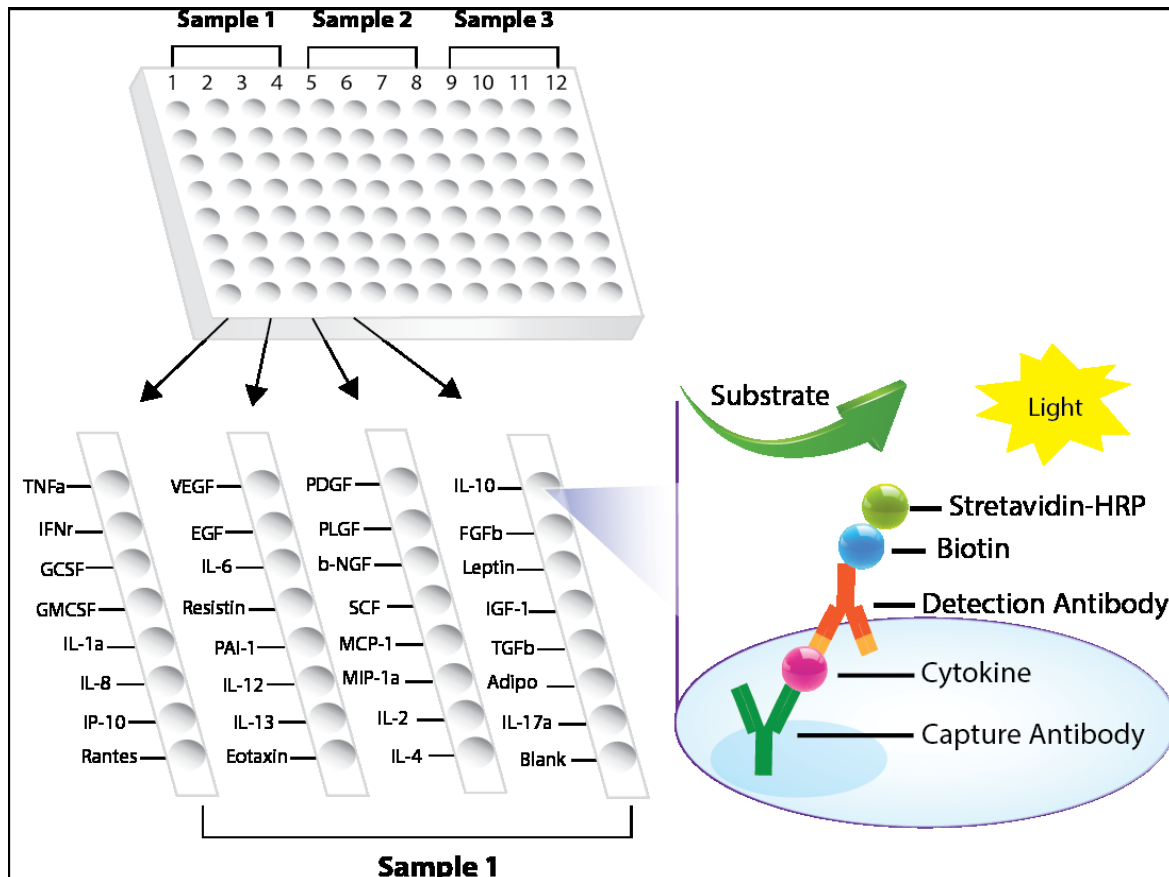


Abbildung 15: Human Cytokine ELISA: Lokalisation der 31 zu testenden Zytokine und Funktionsprinzip der Lichtemission in diesem Assay (Abb. aus www.signosisinc.com/principle/Cytokine_ELISA_Plate_Arrays am 10.07.14)

2.5.2.2 Beschichtung der Membranen

Zuerst wurden die vier mitgelieferten Membranen mit Hilfe einer Pinzette aus ihrer Verpackung genommen und auf die ebenfalls mitgelieferte 4-Well-Platte gelegt. Daraufhin wurde zu jeder Membran 2 ml Blockingpuffer (Array Buffer 4) gegeben und die Platte für eine Stunde auf einem Schüttler zur Inkubation gestellt. In der Zwischenzeit wurden die ausgewählten Zellüberstände aus dem ROS-Assay aufgetaut und für 5 Minuten bei 455 g und Raumtemperatur zentrifugiert. 600 μ l Überstand jeder Probe wurde nun mit jeweils 900 μ l Blockingpuffer in neuen 2 ml Reaktionsgefäßen gemischt und zu jedem der vier Proben 20 μ l Detektionsantikörper (Human Cytokine Array Panel A Detection Antibody Cocktail) gegeben und für eine Stunde auf einem Schüttler zur Inkubation gestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde aus der 4-Well-Platte der Blockingpuffer abgesaugt und auf jede Membran eine der Proben pipettiert und über Nacht auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurden die Membranen mit einer Pinzette von der Platte genommen und jeweils in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben, in das zuvor jeweils 20 ml 1x-Waschpuffer vorgelegt worden war. Die vier Röhrchen wurden auf einem Schüttler für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Waschschrift wurde weitere zwei Mal wiederholt, sodass die Membranen am Ende insgesamt drei Mal für 10 Minuten mit jeweils 20 ml 1x-Waschpuffer gewaschen worden waren. In der Zwischenzeit wurde die 4-Well-Platte mit destilliertem Wasser gewaschen und sorgfältig abgetrocknet. Dann wurden 10 µl Streptavidin-HRP mit 10 ml Array-Buffer 5 in einem weiteren 50 ml Falcon-Röhrchen gemischt und jeweils 2 ml in jedes der vier Fächer der 4-Well-Platte pipettiert. Jetzt wurden die drei Mal gewaschenen Membranen jeweils in ihr Fach der 4-Well-Platte zurückgelegt, die Platte mit Aluminiumfolie abgedunkelt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Schüttler zur Inkubation gestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Membranen erneut, wie vorher beschrieben, drei Mal mit jeweils 20 ml 1x-Waschpuffer für jeweils 10 Minuten gewaschen.

2.5.2.3 Messung des emittierten Lichts

Nach Ablauf des dritten Waschschriftes wurden die Membranen im Waschpuffer belassen, um sie vor Austrocknung zu schützen und der letzte Teil des Zytokin-Assays, das Messen des emittierten Lichts mittels eines Fluoreszenzmikroskops im Labor des Fachbereichs Chemie der Universität zu Lübeck durchgeführt. Die vier Membranen wurden nebeneinander auf einer speziellen Glassplatte angeordnet und jeweils vollständig mit 1 ml Chemilumineszenz-Reagent-Mix bedeckt und zur Messung in das Fluoreszenzmikroskop gestellt. Nach Fokussierung der Kamera wurden Aufnahmen von 10, 20, 60, 120 und 180 Sekunden Bestrahlungsdauer gemacht und sowohl normal, als auch farbinvertiert gespeichert.

2.5.2.4 Statistische Auswertung des Zytokin-Assays

Die Bewertung erfolgte anhand der farbinvertierten Aufnahmen nach 60 Sekunden Bestrahlungsdauer mit Hilfe des Programms ImageJ. Die gewonnen Daten wurden in Microsoft Excel importiert und wegen der geringen Stichprobengröße von nur zwei ($n = 2$) deskriptiv ausgewertet und anschließend in einem Balkendiagramm veranschaulicht.

3 Ergebnisse

3.1 Ausmaß der dermo-epidermalen Spaltbildung in Abhängigkeit von den verwendeten Leukozytensubpopulationen im Kryoschnitt-Assay

Der Kryoschnitt-Assay ist eine in vitro Methode, mit der man die für blasenbildende Autoimmundermatosen charakteristische subepidermale Spaltbildung in vitro nachstellen und somit die Pathogenese der Autoantikörper-induzierten und Leukozyten-abhängigen Blasenbildung untersuchen kann. Aus früheren Studien ist bekannt, dass für die Entstehung der dermo-epidermalen Separation nicht nur die pathogenen Autoantikörper vorhanden sein müssen, sondern auch Leukozyten gesunder Spender.^{54, 98, 104} In meiner Arbeit sollte erforscht werden, welche Leukozytenpopulationen die Entstehung der subepidermalen Spaltbildung bei Vorhandensein von Autoantikörpern triggern können. Um dieses Ziel zu erreichen wurden die mit BP- bzw. EBA-Seren vorbehandelten Hautschnitte mit den jeweiligen zu testenden Leukozytensubpopulationen, anstatt mit Gesamtleukozyten bzw. relativ unrein aufgereinigten Zellpopulationen, inkubiert. Die Reinheitsbestimmung der isolierten Leukozytensubpopulationen erfolgte mittels FACS (Abbildung 16).

Verwendet wurden im Rahmen meiner Untersuchung folgende Leukozytensubpopulationen:

- **PBMC** (mononukleäre Leukozyten → Monozyten und Lymphozyten)
- **PMN** (polymorphkernige Leukozyten → Granulozyten)
- **Wiedervermischung von PMN und PBMC** in verschiedenen Verhältnissen
- **Isolierte Monozyten** (nur 1x durchgeführt, daher in der Ergebnisauswertung nicht berücksichtigt)
- **Gesamtleukozyten**

Als Referenz bzw. Positivkontrolle für die Subpopulationen diente die Durchführung mit Gesamtleukozyten. Als Negativkontrollen wurden Seren von gesunden Spendern verwendet. Für die abschließende Auswertung des Versuchs wurden die fixierten und gefärbten Präparate mikroskopisch betrachtet und der Anteil der dermo-epidermalen Separation in Bezug auf die Gesamtlänge der dermo-epidermalen Junctionszone bestimmt.

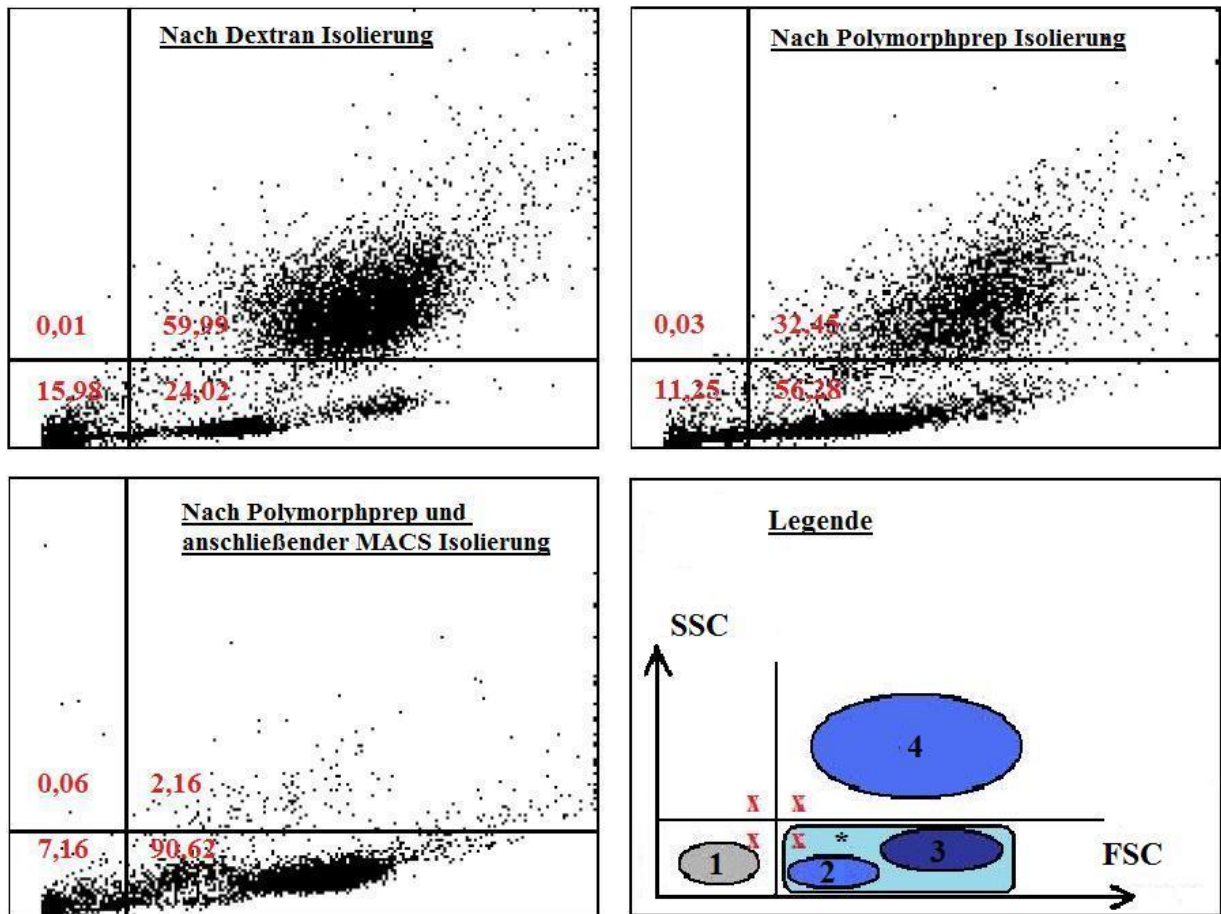
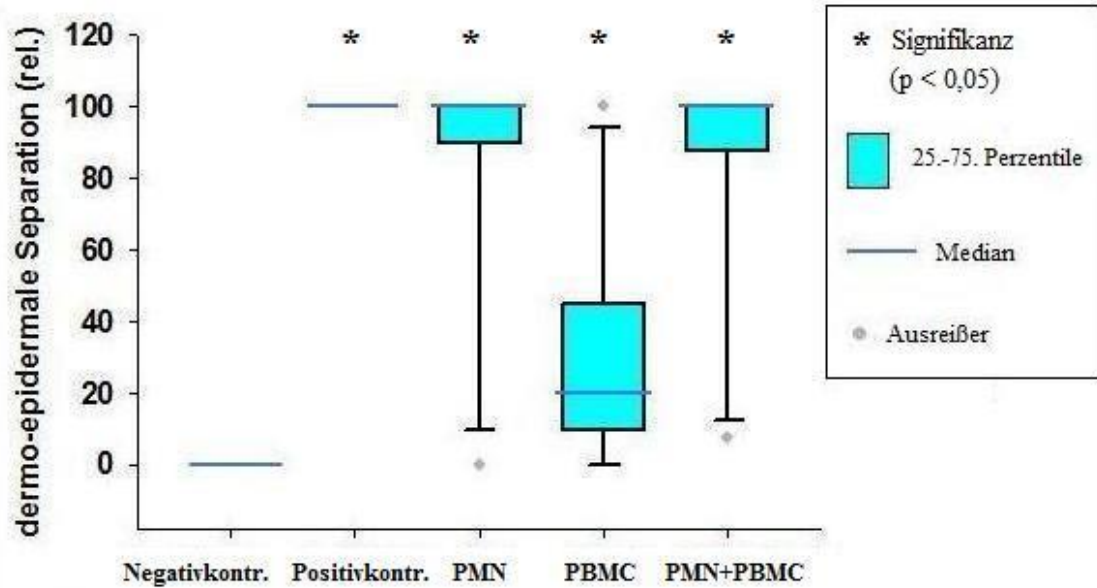


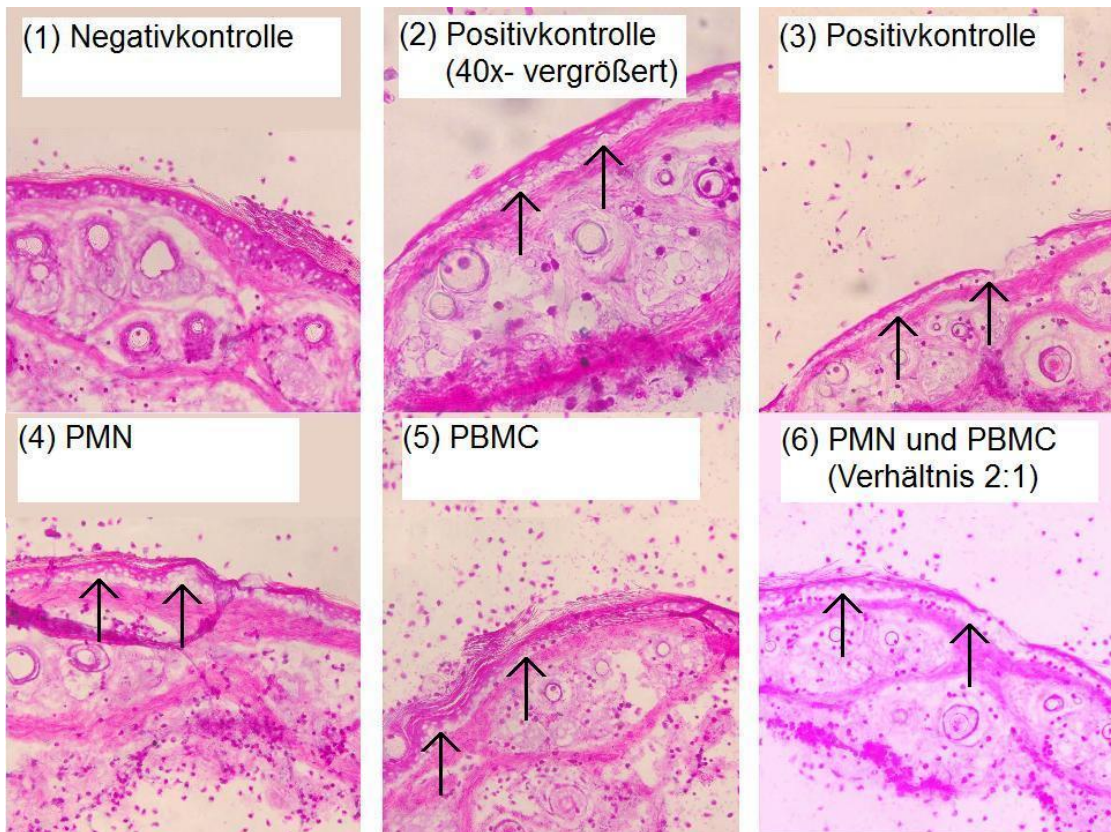
Abbildung 16: Überprüfung der Reinheit der isolierten Leukozytensubpopulationen mittels FACS
Abkürzungen/Legende: SSC: Side Scatter; FSC: Forward Scatter; x: Prozentanteil der jeweiligen Zellfraktion
 1: Zelldebit; 2: Monozyten; 3: Lymphozyten; *: 2+3 → PBMC; 4: Granulozyten/PMN

In **zwei unabhängigen Versuchsreihen** wurde der Kryoschnitt-Assay insgesamt 38 Mal mit 10 verschiedenen positiven Kaninchenseren vom Typ pGEX NC1, die gegen COL7 gerichtet sind und somit in vitro und im Tiermodell zu subepidermalen Blasen führen, durchgeführt. Insgesamt konnten 18 Versuche ausgewertet werden und 13 Versuche (**n = 13**) in die Ergebnisauswertung einfließen. Die übrigen Experimente wurden ausgeschlossen, da entweder nicht alle Leukozytenreihen getestet worden waren oder die Ergebnisse nicht vollständig ausgewertet werden konnten, da ihre Schnitte Spaltartefakte und/oder die Positivkontrollen keine dermo-epidermale Spaltbildung aufwiesen. Die Daten jeder Versuchsreihe wurden auf die **Positivkontrollen (Gesamtleukozyten) normiert**, die so den Wert und **Median von 100%** (25.-75. Perzentilen: 100) erhielten. Bei den **Negativkontrollen** blieb die Separation gänzlich aus (**Median = 0**; 25.-75. Perzentilen: 0) und bei den zutestenden Leukozytenreihen ergaben sich jeweils folgende **Medianwerte:**

PMN - 100%, PMN+PBMC - 100% und PBMC - 20%. Die jeweiligen Werte für die 25.-75. Perzentilen sind der Abbildung 17 zu entnehmen. Eine **statistische Signifikanz ($p < 0,05$) zwischen allen getesteten Leukozytensubgruppen und der Negativkontrolle** konnte im „Student-Newman-Keuls Test“ gezeigt werden. Im Detail betrachtet bestehen zusätzlich signifikante Unterschiede beim Vergleich der Ergebnisse der Gruppen Gesamtleukozyten, PMN und PBMC+PMN mit der Gruppe der PBMC. Keine Signifikanz besteht dagegen zwischen den Ergebnissen der Positivkontrolle mit den PMN bzw. PBMC+PMN. Abbildung 17 zeigt die normierte dermo-epidermale Spaltbildung in Abhängigkeit von der verwendeten Leukozytensubpopulation in einem Boxplot sowie repräsentative histologische Bilder der Haut.



(a)



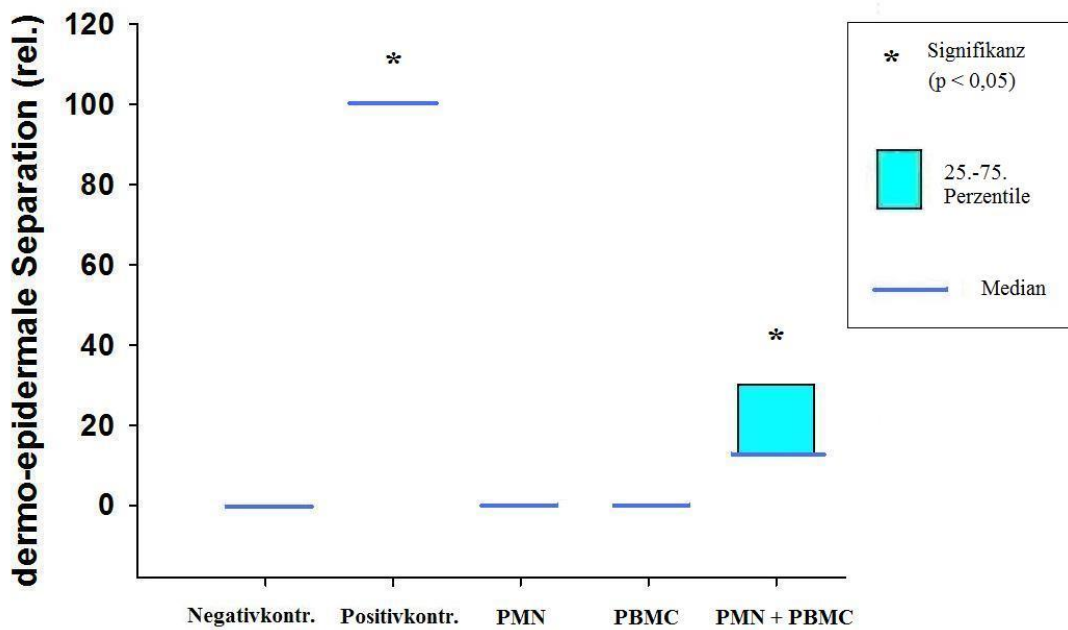
(b)

Abbildung 17

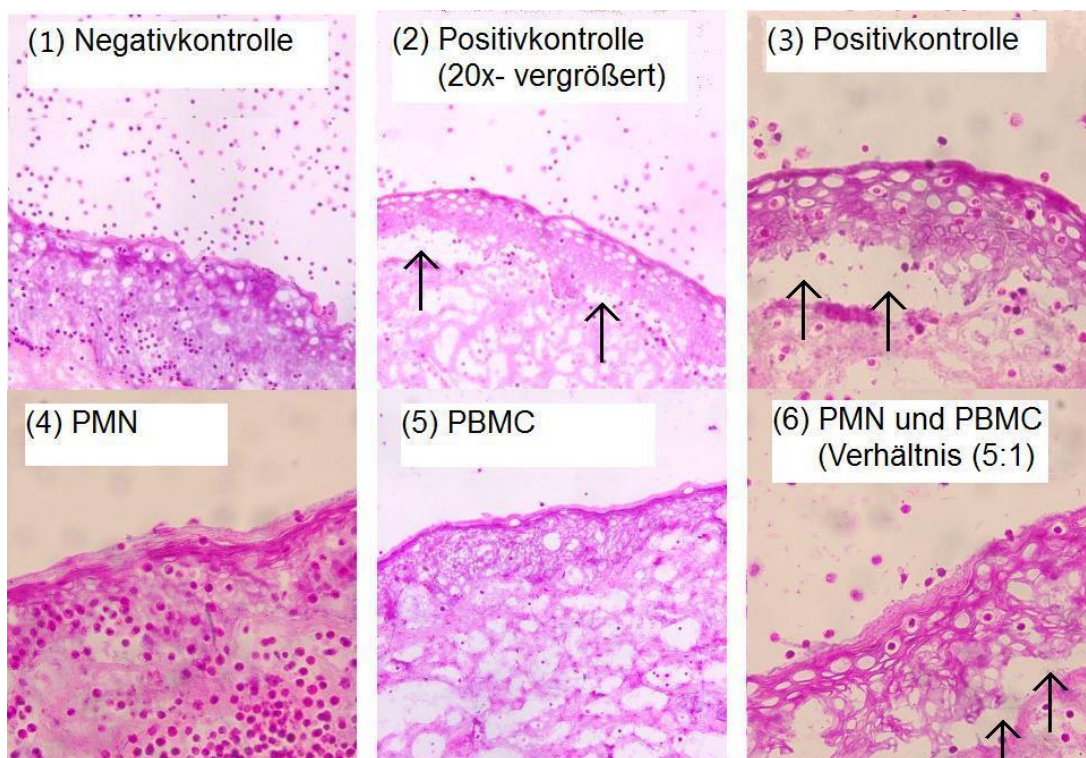
(a) **Ausmaß der dermo-epidermale Spaltbildung veranschaulicht in einem Boxplot.** Aus zwei unabhängigen Versuchsreihen wurden in diesem Boxplot die Ergebnisse der 13 Experimente, bei denen alle Leukozytenreihen getestet und vollständig ausgewertet werden konnten, aufgenommen. Das Ausmaß der dermo-epidermalen Separation ist hier als relative Größe zu verstehen, da alle Werte normiert wurden um den Störeinfluss der Varianz zu beseitigen. Es besteht Signifikanz (*) mit $p < 0,05$ zwischen der Positivkontrolle und der Negativkontrolle, sowie zwischen allen getesteten Leukozytensubgruppe und der Negativkontrolle.

(b) **Repräsentative histologische Bilder der dermo-epidermalen Separation (20-fache Vergrößerung)**

In einer **dritten unabhängigen** Versuchsreihe sollten im Rahmen dieser Arbeit die vorherigen Resultate **mit Patientenserum auf humanen Hautproben** bestätigt werden. Dafür wurden BP-Patientenseren verwendet. Von den insgesamt 10 durchgeführten Kryoschnitt-Assays konnten lediglich 3 Versuche (**n = 3**) vollständig ausgewertet und in die Ergebnisse aufgenommen werden. In 2 der 7 nicht eingehenden Versuche blieb die Positivkontrolle negativ und in den restlichen 5 waren Hautdefekte entstanden, die eine vollständige Auswertung unmöglich machten. Die gesammelten Daten wurden auf die **Positivkontrollen (Gesamtleukozyten) normiert** und es entstand ein **Median von 100%** (25.-75. Perzentilen: 100). In den **Negativkontrollen** blieb die Separation gänzlich aus (**Median = 0**; 25.-75. Perzentilen: 0) und bei den weiteren getesteten Leukozytenreihen ergaben sich jeweils folgende **Mediane: PMN 0%, PMN+PBMC 12,5% und PBMC 0%**. Die jeweiligen Werte für die 25.-75. Perzentilen sind der Abbildung 18 zu entnehmen. Eine **statistische Signifikanz ($p < 0,05$)** sowohl zwischen der **Positivkontrolle** und der **Negativkontrolle**, als auch zwischen der Gruppe der **PMN+PBMC** und der **Negativkontrolle** konnte im „Student-Newman-Keuls Test“ gezeigt werden. Abbildung 18 zeigt die normierte dermo-epidermale Spaltbildung in Abhängigkeit von der verwendeten Leukozytensubpopulation in einem Boxplot sowie repräsentative histologische Bilder der Haut.



(a)



(b)

Abbildung 18

(a) **Ausmaß der dermo-epidermale Spaltbildung veranschaulicht in einem Boxplot.** Darstellung der Ergebnisse aus der dritten Versuchsreihe mit humaner Haut und humanen Seren. Das Ausmaß der dermo-epidermalen Separation ist hier als relative Größe zu verstehen, da die Ergebnisse normiert wurden um den Störeinfluss der Varianz zu beseitigen. Es besteht u. a. Signifikanz (*) mit $p < 0,05$ zwischen der Positivkontrolle und der Negativkontrolle, sowie zwischen der PMN+PBMC-Gruppe und der Negativkontrolle.

(b) **Repräsentative histologische Bilder der dermo-epidermalen Separation (40-fache Vergrößerung)**

3.2 ROS-Ausschüttung aus aktivierten Monozyten im ROS-Assay

Bisher wurde angenommen, dass die neutrophilen Granulozyten, die den Hauptanteil der Gruppe der PMN ausmachen, die verantwortlichen Leukozyten für die dermo-epidermale Separation sind.¹⁰⁴ Meine Ergebnisse am Kryoschnitt-Assay zeigen jedoch, dass bei Anwesenheit von Autoantikörpern sowohl PMN als auch PBMC eine dermo-epidermale Spaltbildung erzeugen können.

Die Tatsache, dass PBMC auch eine Spaltbildung triggern können, warf die Frage auf, welche zellulären Mechanismen sie dafür nutzen. Da bekannt ist, dass ROS entscheidend zur Spaltbildung beitragen,¹⁰⁵ wurde der ROS-Assay verwendet, um zu untersuchen, ob PBMC in der Lage seien ROS freizusetzen. Es erfolgten zwei (**n = 2**) Durchläufe. Die Stimulation der PBMC mit **fMLP diente als Positivkontrolle** und die gesammelten Daten wurden auf die Positivkontrolle **normiert**, sodass hier die ROS-Freisetzung als **100%** (= **Median** und 25.-75. Perzentile) festgelegt wurde. Die Stimulation mit **nur-Antigen (hCOL7)** (**Median = 18%**, 25.-75. Perzentile: 12-24) sowie die Stimulation mit **nur-Antikörper (IgG1)** (**Median = 14%**; 25.-75. Perzentile: 12-16) bildeten die **Negativkontrollen**. Drei verschiedene Konzentrationen von Antigen-Antikörper-Komplexen (Immunkomplexe, IC) waren als Proben für die ROS-Freisetzung festgelegt worden. Die statistische Auswertung mit SigmaPlot13.0 zeigte signifikante Unterschiede zwischen der Positivkontrolle und den Negativkontrollen und keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Negativkontrollen. In der Probenreihe verlief die ROS-Freisetzung proportional zur Konzentrationsverdünnung, sodass die **Probe (IC 1:1)** mit einem **Median von 70%** (25.-75. Perzentile: 68-72) am meisten ROS freisetzen konnte. Der Unterschied zu den Negativkontrollen war nicht signifikant. Deskriptiv ist jedoch eine Tendenz zu erkennen und so deuten diese Ergebnisse an, dass mit EBA-Immunkomplexen aktivierte PBMC in der Lage sind ROS freizusetzen (Abbildung 19).

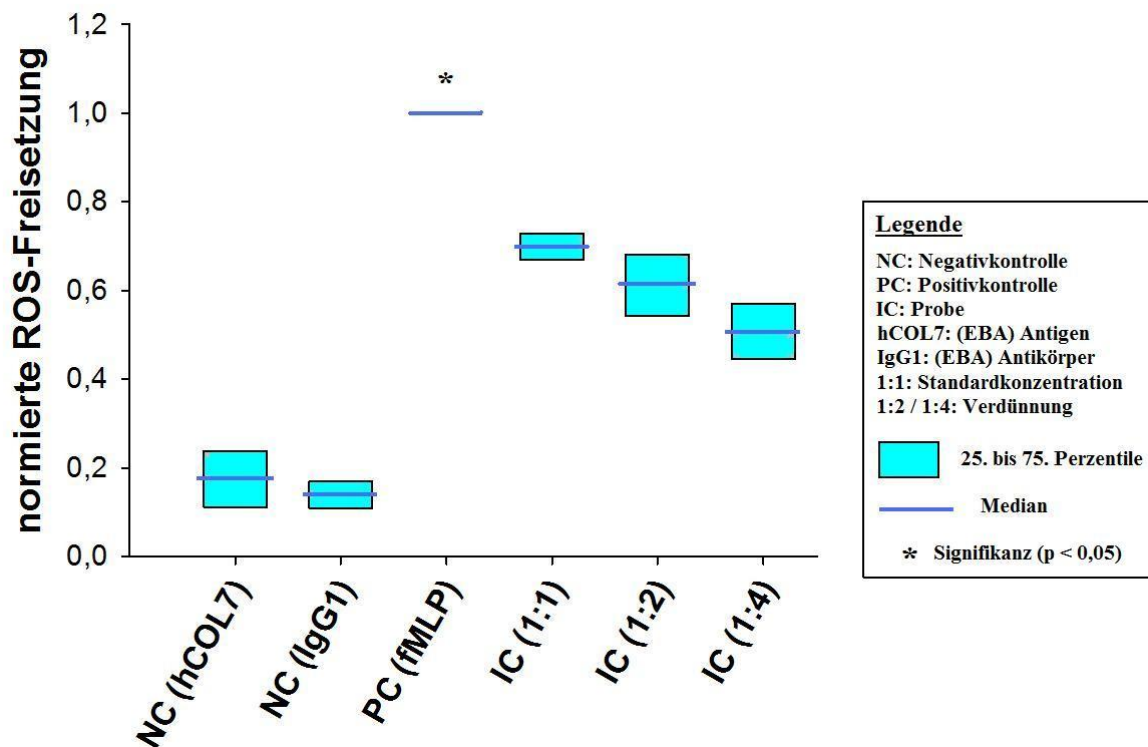


Abbildung 19: Normierte ROS-Freisetzung der stimulierten PBMC im ROS-Assay im Boxplot dargestellt. Es besteht u. a. Signifikanz (*) mit $p < 0,05$ zwischen der Positivkontrolle und den beiden Negativkontrollen.

Diese Ergebnisse motivierten zu einem weiteren unabhängigen Experiment, in dem untersucht werden sollte, ob isolierte Monozyten, die ein Hauptbestandteil der PBMC sind, auch alleine in der Lage seien ROS freizusetzen. Die Isolierung der Monozyten wurde erreicht, indem die Gesamtleukozyten mittels Polymorphprep in PBMC und PMN aufgetrennt wurden und im zweiten Schritt eine positive Selektion der Monozyten aus den PBMC mittels MACS erfolgte. Die Überprüfung der Reinheit der erhaltenen Suspension erfolgte mit der Durchflusszytometrie (FACS) und ergab eine $> 90\%$ ige Reinheit der Monozyten (siehe Abbildung 16 auf Seite 57).

Von den insgesamt vier Durchläufen des ROS-Assays mit isolierten Monozyten konnten drei ($n = 3$) in unsere Ergebnisse aufgenommen werden, da beim vierten andere Messzeiten verwendet worden waren und somit die Vergleichbarkeit zu den anderen Durchgängen aufgehoben war. Die Stimulation der Monozyten mit fMLP diente erneut als Positivkontrolle und die gesammelten Daten wurden auf die Positivkontrolle normiert, sodass hier die ROS-Freisetzung als 100% (Median = 100%; 25.-75. Perzentile: 100)

festgelegt wurde. Die Stimulation mit nur-Antigen (hCOL7) sowie die Stimulation mit nur-Antikörper (IgG1) bildeten erneut die Negativkontrollen. Drei verschiedene Konzentrationen von Antigen-Antikörper-Cocktails (IC) waren auch dieses Mal als Proben für die ROS-Freisetzung festgelegt worden. Es ergab sich in allen Versuchsreihen eine ROS Freisetzung, die erneut proportional zu Verdünnungskonzentration stand und somit in der Probe (IC 1:1) am stärksten ausfiel. Die Unterschiede untereinander waren nicht signifikant (Abbildung 20).

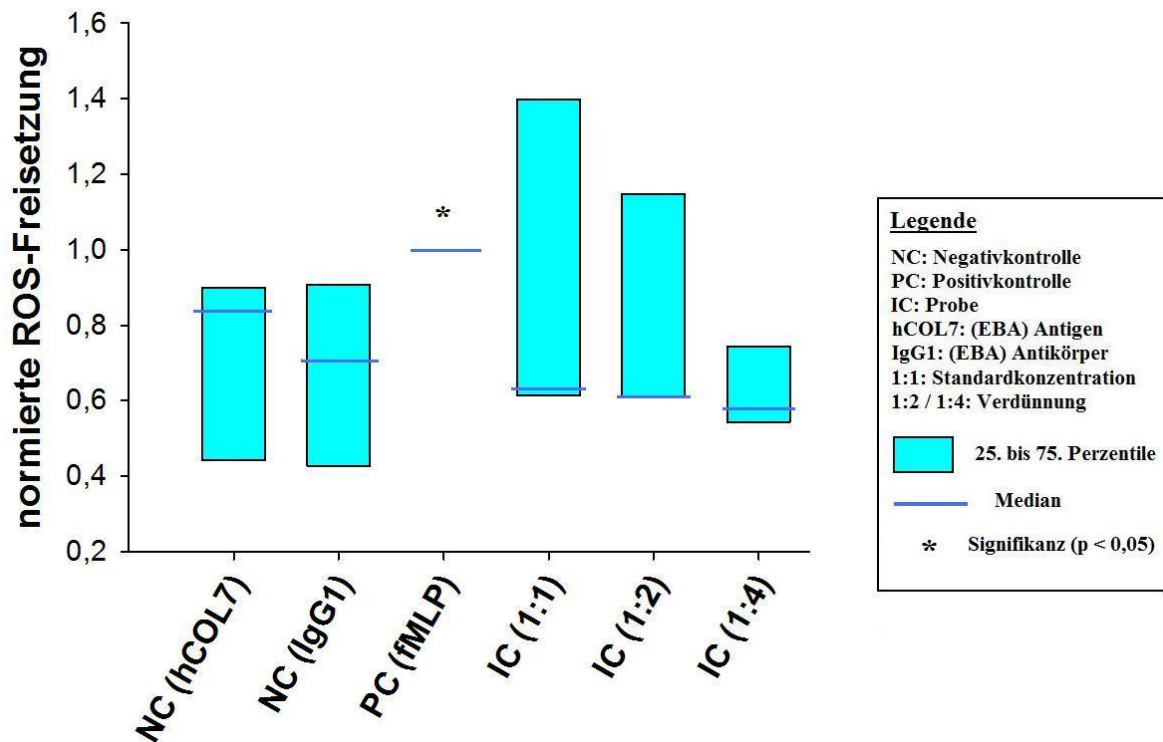


Abbildung 20: Normierte ROS-Freisetzung der stimulierten isolierten Monozyten im ROS-Assay im Boxplot dargestellt. Es besteht statistische Signifikanz (*) mit $p < 0,05$ zwischen der Positivkontrolle und den Negativkontrollen.

3.3 Zytokin-Ausschüttung aus aktivierten Monozyten im Zytokin-Assay

Zytokine sind extrazelluläre Signalmoleküle, die von Zellen in Abhängigkeit von der Zellart und dem Aktivierungszustand ausgeschüttet werden. Nachdem zuvor im ROS-Assay gezeigt werden konnte, dass mit EBA-Antigen-Antikörperkomplexen aktivierte Monozyten ROS freisetzen können, untersuchte ich anschließend, ob und wenn ja, welche Zytokine von aktivierten Monozyten freigesetzt werden. Dazu wurden direkt im Anschluss an den ROS-Assay die Zellüberstände mit den vermeidlichen Zytokinen abgenommen und für dieses explorative Experiment verwendet. In den vier mitgelieferten Membranen des Zytokin-Assays sollten zwei Proben mit jeweils einer Negativkontrolle getestet werden. Als Testprobe zur Bestimmung der Zytokinfreisetzung wurde die (IC 1:1) Probe von zwei unterschiedlichen ROS-Assay Versuchstagen genommen. Als Negativkontrolle wurden von den gleichen Versuchstagen die nur-Antikörper-Negativkontrollen (IgG1) vom ROS-Assay verwendet.

Der daraufhin durchgeführte Zytokin-Assay verlief erfolgreich, da die testinternen Positivkontrollen positiv und die testinternen Negativkontrollen negativ ausschlugen, sodass die Resultate des Zytokin-Assays in die Auswertung einfließen konnten. Insgesamt sollte dieser Versuch aber eher als ein exploratives Experiment angesehen werden, da die Probenzahl mit $n = 2$ gering war. Es konnte dennoch deskriptiv festgestellt werden, dass im Verhältnis zu den testinternen Positiv- und Negativkontrollen folgende fünf Zytokine vermehrt ausgeschüttet wurden: Gro- α , IL-1Ra, IL-8, MIF und TNF- α . Beim genauen Abgleich der zwei Proben mit ihren Negativkontrollen, stellten wir fest, dass von den zuvor genannten fünf Zytokinen folgende drei in den Proben deskriptiv zweifelsfrei mehr ausgeschüttet worden waren als in ihren Negativkontrollen: **Gro- α , IL-8** und **TNF- α** . Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es in aktivierten Monozyten zu einer verstärkten Zytokinfreisetzung von Gro- α , IL-8 und TNF- α kommt. Abbildungen 20 und 21 zeigen die Ergebnisse des Zytokin-Assays.

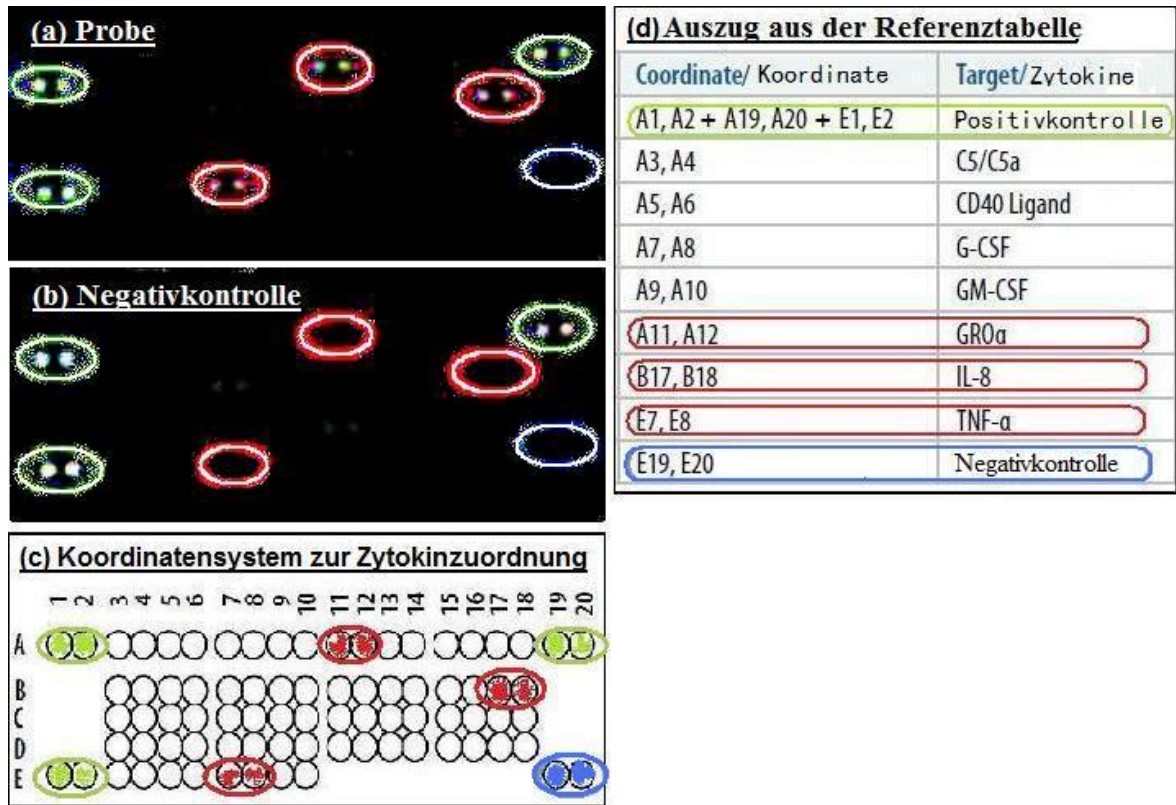


Abbildung 20: Ablichtung der entstandenen Gele im Rahmen des Zytokin-Assays. Beispielhaft dargestellt sind hier (a) Probe1 und (b) Negativkontrolle1. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines im Zytokin-Kit mitgelieferten (c) Koordinatensystems und der dazugehörigen (d) Referenztafel.

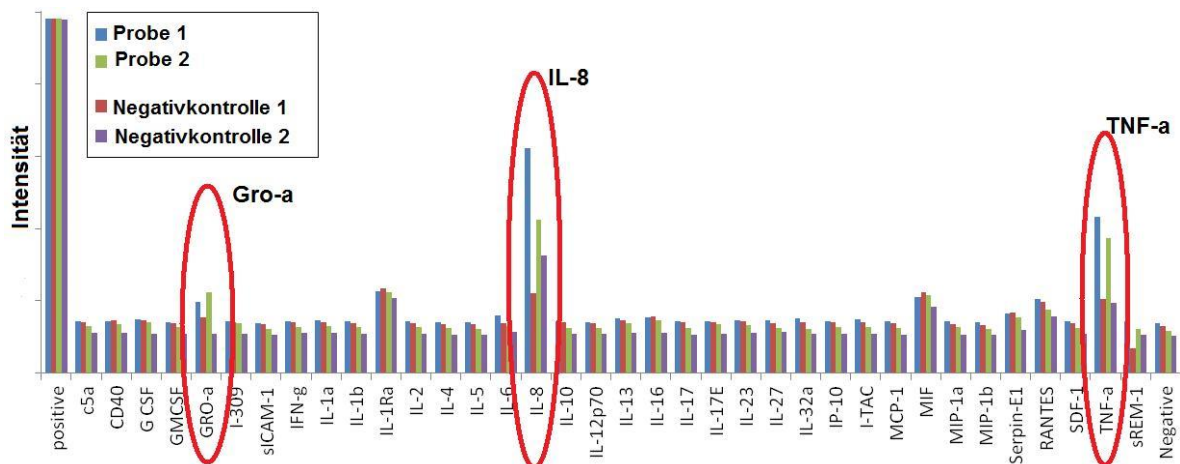


Abbildung 21: Zytokinfreisetzung aus aktivierten Monozyten im Zytokin-Assay dargestellt im Säulendiagramm.

Die aufgeführten Werte entstammen der Auswertung der Gele aus Abbildung 20. Aufgetragen sind die 31 getesteten Zytokine gegen ihre gemessene Konzentration (Intensität). Blau und Grün dargestellt sind die Testproben, Rot und Lila ihre Negativkontrollen.

4 Diskussion

Das bullöse Pemphigoid und die Epidermolysis bullosa acquisita sind blasenbildende Autoimmundermatosen, die immunpathologisch durch Autoantikörper gegen hauteigene Strukturproteine verursacht werden.^{3, 4} Beide Krankheiten gehören zur Gruppe der Pemphigoiderkrankungen, deren Autoantikörper hemidesmosomale Strukturproteine erkennen und die Spaltbildung zwischen Epidermis und Dermis, also subepidermal verläuft.^{3, 11-13} Mit Hilfe des Kryoschnitt-Assays ist es möglich eine subepidermale Separation *in vitro* auszulösen und somit Aspekte der Pathogenese dieser Krankheiten zu erforschen.¹⁰⁴ Das Prinzip des Kryoschnitt-Assays basiert auf folgenden Schritten: Man nimmt Kryoschnitte gesunder Haut und inkubiert diese mit Antikörper-haltigen Serum, sodass man Hautschnitte erhält, die pathogene Antikörper an der DEJ enthalten. Nun gibt man vitale Leukozyten gesunder Spender dazu, die durch die Antigen-Antikörperkomplexe aktiviert werden und durch Ausschüttung von ROS und Proteasen letztendlich die Spaltbildung auslösen. Abschließend müssen die Hautschnitte mit H&E gefärbt und die erzeugte dermo-epidermale Separation mikroskopisch ausgewertet werden.^{45, 46, 102, 104-106} Mit diesem *ex vivo* Modell konnte bereits gezeigt werden, dass für die Krankheitsentstehung aktivierte Granulozyten im Umfeld einer vitalen Gesamtleukozytenpopulation erforderlich sind.^{54, 127} Allerdings gab es noch keine Studien zur Beantwortung der Frage, ob hoch aufgereinigte isolierte Granulozyten in Abwesenheit anderer Leukozytenpopulationen oder ob andere Leukozytensubpopulationen in Abwesenheit von Granulozyten nicht ebenfalls im Stande seien eine Spaltbildung zu erzeugen. Erste Ansätze zur Beantwortung dieser Fragen sollten im Rahmen meiner Arbeit gefunden werden. Zunächst untersuchte ich mit Hilfe des Kryoschnitt-Assays verschiedene isolierte Leukozytenpopulationen auf ihr Potential eine Spaltbildung zu erzeugen. Dabei stellte ich unter anderem fest, dass die isolierte Gruppe der PBMC (bestehend aus Monozyten und Lymphozyten) auch ohne Granulozyten in der Lage ist im Kryoschnitt-Assay eine dermo-epidermale Separation auszulösen. Diese Ergebnisse warfen unweigerlich die Frage auf, welcher zellulären Mechanismen sich die aktivierten PBMC dafür bedienen. Da bereits bekannt ist, dass ROS und einige Zytokine eine wichtige Rolle in der Pathogenese der bullösen Autoimmundermatosen besitzen,^{48, 49, 54, 105, 128} isolierte ich aus Vollblut PBMC sowie Monozyten und untersuchte im Rahmen des ROS- und Zytokin-Assays, ob sie in der Lage seien reaktive Sauerstoffspezies und Zytokine auszuschütten.

4.1 Die Wertigkeit des Kryoschnitt-Assays zur Untersuchung der Pathomechanismen beim BP und bei der EBA

Der verwendete Kryoschnitt-Assay stellt ein ex vivo Modell dar, dass Aspekte der Pathogenese des BP und der EBA sowohl mit Hilfe von humanem Material als auch mit Hilfe von tierischem Material untersuchen lässt. Insbesondere die Verwendung gesunder humaner Haut, Seren von BP- bzw. EBA-Patienten und Leukozyten gesunder Blutspender ermöglicht es ex vivo Untersuchungsbedingungen zu schaffen, die die Prozesse im menschlichen Organismus hervorragend widerspiegeln. Aber auch bei Verwendung von Kaninchenseren und Maushautschnitten bestehen weiterhin sehr gute Bedingungen, um Aspekte der Pathogenese dieser Erkrankungen zu erforschen.^{104, 105} Bei letzterem sollten jedoch die Ergebnisse nicht bedenkenlos auf den Menschen übertragen werden.

Eine der wichtigsten positiven Eigenschaften des Kryoschnitt-Assays ist es, dass er die auftretenden Effekte klinisch bzw. histologisch realitätstreu abbildet. Weiterhin ist der Kryoschnitt-Assay relativ gut reproduzierbar. Im Vergleich zu klinischen Studien hat der Kryoschnitt-Assay einen weiteren großen Vorteil: Es lassen sich definierte Versuchsbedingungen erstellen, unter denen man ganz gezielt einzelne Bereiche der Pathogenese untersuchen kann und dies auch bei seltenen Erkrankungen. Somit stellt der Kryoschnitt-Assay eine reproduzierbare, relativ einfache, kostengünstige und realitätsnahe Möglichkeit dar, Aspekte der Pathogenese (der Autoantikörper-induzierten Gewebeschädigung) von subepidermal blasenbildenden Autoimmundermatosen zu untersuchen.

In dieser Arbeit konnte erneut gezeigt werden, dass es nach Inkubation von Kryoschnitten mit BP- bzw. EBA-Serum nach Zugabe von Leukozyten gesunder Spender zu einer dermoepidermalen Spaltbildung kommt, hingegen nach Inkubation mit gesundem Serum die Spaltbildung gänzlich ausbleibt. Dies konnte das erste Mal von Gammon et al. 1982 publiziert werden.⁴⁵ Die Bedeutung von Komplementfaktoren, die nach Jordon et al. eine wichtige Rolle für die Rekrutierung von Leukozyten aus den Blutgefäßen an die dermoepidermale Junctionszone spielen, kann der Kryoschnitt-Assay nicht beantworten, da bei seiner Durchführung die Hautschnitte mit den Leukozyten in direkten Kontakt gebracht werden und eine Komplement-vermittelte Rekrutierung überflüssig wird.⁴⁶

Interpretationsprobleme entstehen beim Kryoschnitt-Assay bezüglich der Tatsache, dass das Ausmaß der dermo-epidermalen Separation, die am Ende mikroskopisch ausgewertet wird, sehr störanfällig auf Variationen von BP- bzw. EBA-Seren und Spenderleukozyten reagiert. Konkret bedeutet dies, dass trotz zweifelsfreier Verwendung von EBA- bzw. BP-Patientenserum und vitalen Leukozyten gesunder Spender unter korrekter Ausführung des Protokolls, die Spaltbildung auch in der Positivkontrolle gänzlich ausbleiben kann. Ein Wechsel des Leukozytenspenders oder die Benutzung eines anderen Patientensersums kann bei einem neuen Versuchsdurchlauf eine Spaltbildung bewirken. Das absolute Ausmaß der Spaltbildung ist somit vom Patientenserum und von den Spenderleukozyten abhängig. Die relativen Unterschiede in einer Versuchsreihe sind dagegen von diesen Faktoren unbeeinflusst, da innerhalb einer Versuchsreihe dieselben Spenderleukozyten und Patientenseren verwendet werden. Blieb im Rahmen dieser Arbeit letztendlich eine Spaltbildung in der Positivkontrolle aus, wurden die entsprechenden Versuchsreihen in die Ergebnisse nicht aufgenommen.

Eine zweite dominante Störquelle im Kryoschnitt-Assay ist die manuelle Schädigung der Hautschnitte, die vor allem beim Waschvorgang nach erfolgter Inkubation mit Leukozyten entsteht. Die Beschädigung der Kryoschnitte machte oftmals die abschließende mikroskopische Beurteilung der dermo-epidermalen Separation unmöglich, sodass betroffene Versuchsreihen ebenfalls aus den Ergebnissen ausgeschlossen wurden.

Insgesamt bleibt der Kryoschnitt-Assay ein gutes Instrumentarium zur Erforschung der Pathogenese von bullösen Autoimmundermatosen. Man muss aber im Hinterkopf behalten, dass er nur in der Lage ist einen von mehreren Aspekten der Krankheitsentstehung wiederzugeben. So gilt für ihn, dass er sich ausschließlich auf die Autoantikörper-induzierte Gewebeschädigung fokussiert. Das bedeutet, dass Aspekte, die überhaupt erst zur Bildung der Autoantikörper führen, im Kryoschnitt-Assay gänzlich nicht zur Geltung kommen.

4.2 Ausmaß der dermo-epidermalen Spaltbildung in Abhängigkeit von der verwendeten Leukozytensubpopulation im Kryoschnitt-Assay

Für die Entstehung der dermo-epidermalen Spaltbildung sind direkt pathogene Autoantigene und Leukozyten gesunder Spender unerlässlich.⁴⁵ Bisher durchgeführte in vitro und Mausmodelle konnten zeigen, dass für die Krankheitsentstehung aktivierte Granulozyten erforderlich sind.^{54, 102, 104, 127} In dieser Arbeit wollte ich mittels des Kryoschnitt-Assays herausfinden, ob auch andere Leukozytenpopulationen in der Lage seien bei Anwesenheit von Autoantigenen eine dermo-epidermale Separation auszulösen. Dazu isolierte ich zunächst aus Vollblut gesunder Spender PMN sowie PBMC und führte den Kryoschnitt-Assay mit diesen Leukozytensubgruppen durch. Erwartungsgemäß konnte die Gruppe der PMN, die größtenteils aus neutrophilen Granulozyten besteht, eine Spaltbildung triggern, deren Ausmaß deskriptiv interessanterweise unter dem der Gesamtleukozyten lag. Trotzdem konnten die Ergebnisse von Liu bestätigt werden, dass die Granulozyten eine herausragende Rolle in der Pathogenese des BP besitzen.⁵⁴ Weiterhin stellte ich fest, dass auch die Gruppe der PBMC eine dermo-epidermale Separation auszulösen vermag. Der Begriff PBMC steht im Englischen für: Peripheral Blood Mononuclear Cell (zu Deutsch: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes). Darunter werden einkernige Blutzellen verstanden, die einen runden Zellkern besitzen (Lymphozyten und Monozyten). In einem weiteren Versuch wollte ich nun demonstrieren, dass isolierte Monozyten in der Lage seien eine Spaltbildung im Kryoschnitt-Assay zu erzeugen. Allerdings musste ich aufgrund von praktischen Schwierigkeiten v. a. wegen des hierfür zu großen Spenderblutbedarfs das Experiment nach nur einem Testdurchlauf aufgeben. Trotzdem konnte ich zum ersten Mal zeigen, dass auch in Abwesenheit von Granulozyten eine Spaltbildung mit dem Kryoschnitt-Assay in vitro auszulösen ist und somit Granulozyten nicht die einzigen Leukozyten sind, die eine dermo-epidermale Spaltbildung bei Pemphigoiderkrankungen auslösen können. Interessanterweise stellte ich weiterhin fest, dass innerhalb einer Versuchsreihe, in der die Spenderleukozyten und Patientenserum dieselben blieben, das Ausmaß der dermo-epidermalen Spaltbildung bei Verwendung von isolierten PMN und isolierten PBMC deskriptiv geringer ausfiel, als bei sowohl Gesamtleukozyten, als auch bei Wiederauslegung der PMN mit den PBMC. Da die Zellzahl vor jedem Versuch bestimmt und durch Zugabe von entsprechendem

Medium auf einen konstanten physiologischen Zielwert bei jeder Versuchsreihe eingestellt wurde, können diese Unterschiede nicht auf Schwankungen der Leukozytenzahl zurückgeführt werden. Somit ist anzunehmen, dass die Leukozytenpopulationen untereinander interagieren und sich gegenseitig beeinflussen und dadurch zusammen am potentesten agieren. Das unterschiedliche Ausmaß der Spaltbildung bei Gesamtleukozyten im Vergleich zu den wieder zusammengelegten PMN und PBMC lässt sich nicht auf unterschiedliche Zellarten zurückführen, da das Wiedermischen von isolierten PMN und PBMC der Population der Gesamtleukozyten praktisch entspricht. Um auszuschließen, dass der Grund darin liegt, dass nach Wiedermischen der PMN und PBMC die relativen Anteile der verschiedenen Zellarten nicht mehr den physiologischen Anteilen der Gesamtleukozyten entsprechen, wurden mehrere Konzentrationsverhältnisse im Kryoschnitt getestet. Hierbei entstanden in den Gruppen keine signifikanten Unterschiede, sodass anzunehmen ist, dass das genaue Mengenverhältnis der Leukozytenpopulationen zueinander weniger wichtig ist, als die Tatsache der Anwesenheit aller. Möglicherweise lässt sich die Divergenz teilweise damit erklären, dass die Isolierung auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgte und dadurch die Leukozyten sich in Abhängigkeit vom jeweiligen Isolierungsprotokoll in unterschiedlichen Aktivierungszuständen befanden und somit unterschiedlich potent die Spaltbildung triggern konnten.

Zusammenfassend konnte ich anhand meiner Ergebnisse zeigen, dass neben den Granulozyten auch die Gruppe der PBMC, bestehend aus vorwiegend Monozyten und Lymphozyten, in der Lage ist eine dermo-epidermale Separation zu erzeugen. Am stärksten fiel die Spaltbildung dann aus, wenn alle Leukozytenspezies vorhanden waren, sodass anzunehmen ist, dass Granulozyten mit Monozyten und Lymphozyten interagieren. Dies sind neue Anhaltspunkte in der Pathogenese der Pemphigoiderkrankungen.

4.3 Der ROS-Assay und die Bedeutung der ROS-Freisetzung aus aktivierten Monozyten

Werden Leukozyten in einen aktivierten Zustand gebracht, so können sie radikale Sauerstoffspezies bilden und ausschütten. Der ROS-Assay stellt eine sensitive Methode dar, diese ausgeschütteten radikalen Sauerstoffspezies zu messen. Liu et al. konnte bereits zeigen, dass aktivierte Granulozyten radikale Sauerstoffspezies freisetzen, denen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der dermo-epidermalen Separation zugesprochen wird.⁴⁷ Nachdem ich im Kryoschnitt-Assay zeigen konnte, dass PBMC, die überwiegend aus Monozyten und Lymphozyten bestehen, ebenfalls eine dermo-epidermale Separation triggern können, wollte ich deren Potential ROS freizusetzen untersuchen. Es gelang mir zu zeigen, dass PBMC in der Lage sind ROS freizusetzen. Daraufhin entschied ich mich den Fokus auf isolierte Monozyten zu legen und deren alleiniges Potential auf die ROS-Freisetzung zu untersuchen. Dazu mussten die Monozyten zunächst mittels Polymorphprep und MACS isoliert werden. Um die späteren Ergebnisse sicher den Monozyten zusprechen zu können musste im Voraus ihre Isolierungsreinheit mittels FACS überprüft werden. Das hierbei erhaltene Ergebnis, nämlich eine Reinheit (anhand der Zellmorphologie) von über 90% war zufriedenstellend, sodass die erhaltenen Effekte sehr wahrscheinlich auf isolierte Monozyten zurückgeführt werden können. Anschließend konnte ich im Rahmen des ROS-Assays deskriptiv zeigen, dass isolierte Monozyten in der Lage sind radikale Sauerstoffspezies freizusetzen, wenn sie zuvor mit (EBA-) Immunkomplexen aktiviert wurden. Dass die gesammelten Daten nicht signifikant waren, liegt denke ich, größtenteils daran, dass die Fallzahl für die aufgetretene relativ hohe Varianz zu gering war. Deskriptiv ist eine Tendenz zu erkennen, dass Monozyten in der Lage sind ROS freizusetzen. Es wäre wichtig diese Ergebnisse in weiteren Experimenten mit größeren Fallzahlen zu untermauern. Trotzdem ist dies eine neue und wichtige Erkenntnis, die vermuten lässt, dass Monozyten teilweise auf gleiche zelluläre Mechanismen zurückgreifen wie Granulozyten, um eine dermo-epidermale Separation auszulösen.

4.4 Zytokin-Assay und die Bedeutung der Zytokin-Freisetzung aus aktivierten Monozyten – ein exploratives Experiment

In meiner Arbeit wurden Monozyten gesunder Spender mit EBA-Antigen-Antikörperkomplexen aktiviert und mittels eines Zytokin-Assays überprüft, ob sie in der Lage seien Zytokine freizusetzen. Ameglio et al. und Zentner et al. hatten bereits gezeigt, dass zwischen TNF- α und den Interleukinen IL-1 β , IL-8 und IL-5 eine deutliche Korrelation mit der Krankheitsaktivität des BP besteht.^{48, 49} Somit gilt in der Pathogenese der Autoimmundermatosen die wichtige Rolle der Zytokine als unumstritten. In meiner Arbeit konnte ich deskriptiv demonstrieren, dass mit EBA-Autoimmunkomplexen aktivierte Monozyten Zytokine freisetzen. Bemerkenswerterweise gehörten zwei der drei Zytokine, die von aktivierten Monozyten vermehrt ausgeschüttet wurden, zu denen, für die eine Korrelation mit der Krankheitsaktivität beim BP bereits gezeigt wurde, nämlich IL-8 und TNF- α . Das dritte Zytokin Gro- α (Growth-regulated-protein alpha) wird bislang in Verbindung mit Melanozyten, Entzündungen und Tumorerntstehung gebracht. Welche Rolle Gro- α bei Pemphigoiderkrankungen spielt, muss weiter erforscht werden. Da ich bei diesem explorativen Experiment keine Signifikanzüberprüfung aufgrund der geringen Fallzahl von zwei Proben vornahm, dürfen die gesammelten Ergebnisse nur als eine Tendenz bzw. Denkanstoß gewertet werden. Eine Bestätigung meiner Ergebnisse sollte mit weiteren Experimenten und größeren Fallzahlen angestrebt werden. Nichtsdestotrotz stehen meine gesammelten Ergebnisse im Einklang mit den Erkenntnissen von Ameglio et al. und Zentner et al., die bereits für das BP zeigen konnten, dass aktivierte Granulozyten unter anderem IL-8 und TNF- α ausschütten.^{48, 49} Mir gelang es nun tendenziell zu zeigen, dass zum Teil gleiche Zytokine bei der EBA von aktivierten Monozyten freigesetzt werden. Meine Ergebnisse bestätigen nicht nur die wichtige Rolle der Zytokine in der Pathogenese der Pemphigoiderkrankungen, sondern demonstrieren auch die Kongruenz bei einigen Aspekten der Pathogenese des BP und der EBA. Außerdem lassen meine Ergebnisse annehmen, dass Monozyten und Granulozyten auf ein ähnliches Zytokinprofil im aktivierten Zustand zurückgreifen.

4.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht wie bislang angenommen nur Granulozyten in der Lage sind eine dermo-epidermale Separation bei Pemphigoiderkrankungen auszulösen.¹⁰⁴ Ich konnte mit Signifikanz demonstrieren, dass die Leukozytensubpopulation der PBMC, vorwiegend bestehend aus Monozyten und Lymphozyten ebenfalls eine dermo-epidermale Spaltbildung triggern kann. Darüber hinaus lassen meine Ergebnisse vermuten, dass es zur Interaktion von Granulozyten mit Monozyten und Lymphozyten kommt, durch die möglicherweise der Aktivierungszustand der Zellen angehoben wird und sie so wirkungsvoller die subepidermale Blasenbildung triggern können. Ob es tatsächlich zu einer synergetischen Interaktion kommt und wie diese im Detail aussieht, lässt sich mit dem hier verwendeten Modell nicht beantworten. Hierfür wäre es interessant andere Experimente durchzuführen, die diesen Aspekt besser abbilden können.

Mit dem ROS-Assay konnte ich deskriptiv zeigen, dass neben Granulozyten auch PBMC sowie auch isolierte Monozyten radikale Sauerstoffspezies freisetzen, wenn sie zuvor mit (EBA-) Immunkomplexen aktiviert wurden. Die ROS-Ausschüttung ist ein wichtiger Pathomechanismus zur Auslösung subepidermaler Blasen bei Pemphigoiderkrankungen.⁵⁰ Darauf aufbauende Studien mit größeren Fallzahlen müssen meine Ergebnisse noch bestätigen.

Im Zytokin-Assay, der von mir als ein exploratives Experiment im Anschluss an den ROS-Assay durchgeführt wurde, konnte ich deskriptiv demonstrieren, dass aktivierte Monozyten auch Zytokine ausschütten. Mit IL-8 und TNF- α waren im Rahmen des Zytokin-Assays zwei Zytokine vermehrt freigesetzt worden, für die bereits eine Korrelation mit der Krankheitsaktivität beim BP als bewiesen gilt.^{48, 49} Meine gesammelten Tendenzen und Erkenntnisse lassen somit vermuten, dass aktivierte Monozyten auf teilweise gleiche Pathomechanismen zurückgreifen wie aktivierte Granulozyten. Im nächsten Schritt müssten diese Ergebnisse in weiteren Experimenten untermauert werden.

Außerdem wäre es nun auch interessant zu prüfen, ob isolierte Monozyten sowohl im Kryoschnitt-Assay, als auch in Tiermodellen in der Lage sind eine dermo-epidermale

Separation auszulösen. Im Rahmen der Erstellung meiner Arbeit, stellte ich fest, dass unter Verwendung der hier dargestellter Isolierungsmethoden zum Erhalt ausreichender Mengen isolierter Monozyten für den Kryoschnitt-Assay der benötigte Spenderblutbedarf unverhältnismäßig groß war, sodass entweder andere Isolierungsmethoden oder andere Experimente zur Beantwortung dieser Frage empfehlenswert sind. Nichtsdestotrotz lassen meine gesammelten Ergebnisse aus dem Kryoschnitt-, ROS- und Zytokin-Assay vermuten, dass isolierte Monozyten im Stande sein sollten eine dermo-epidermale Separation auszulösen.

Aufbauend auf meinen gesammelten Ergebnissen zu isolierten Monozyten und den bereits bekannten Daten von Liu et al., Ameglio et al. und Zentner et al. zu Granulozyten ist stark davon auszugehen, dass vor allem ROS, IL-8 und TNF- α wichtige Mediatoren in der Pathogenese sowohl des BP als auch der EBA sind.^{48-50, 54} Spannend wäre es zu untersuchen, ob diese Zytokine zusammen mit radikalen Sauerstoffspezies in der Lage sind in Abwesenheit jeglicher Leukozyten eine dermo-epidermale Spaltbildung zu erzeugen. Hierfür könnte man zum Beispiel mittels des Kryoschnitt-Assays Hautschnitte anstatt mit Leukozyten direkt mit den oben genannten Mediatoren/Proteasen inkubieren und auf dermo-epidermale Separation untersuchen.

5 Zusammenfassung

Das bullöse Pemphigoid und die Epidermolysis bullosa acquisita sind blasenbildende Autoimmundermatosen, die zur Gruppe der Pemphigoide gehören. Beide Krankheiten zeichnen sich durch pathogene Autoantikörper gegen hemidesmosomale Strukturproteine und einer subepidermalen Blasenbildung aus. Die Bindung der Autoantikörper an ihre Antigene führt zur Komplementaktivierung und der nachfolgenden Einwanderung von Leukozyten in die dermo-epidermale Junctionszone der Haut. Die aktivierten Leukozyten führen zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und Entzündungsmediatoren, die eine Trennung der Dermis von der Epidermis letztendlich bewirken. Klinisch imponieren pralle Blasen, die histologisch subepidermal verlaufen.

Das Gefrierschnittmodell wurde von Gammon et al. 1982 entwickelt und wird seit dem zur Aufschlüsselung von Aspekten der Pathogenese der Autoantikörper-induzierten Gewebeschädigung (Blasenbildung) bei Pemphigoiderkrankungen verwendet. Es basiert auf der Inkubation gesunder Hautschnitte mit Autoantikörper-haltigen Patientenserum und einer anschließenden erneuten Inkubation mit vitalen Leukozyten gesunder Spender, die durch die anwesenden Immunkomplexe aktiviert werden und die dermo-epidermale Separation durch Ausschüttung von ROS und Proteasen auslösen.

In meiner Arbeit wurde mittels des Gefrierschnittmodells untersucht, welche Leukozytensubpopulationen in der Lage sind eine dermo-epidermale Separation auszulösen. Hierzu wurde der Kryoschnitt-Assay mit unterschiedlichen isolierten Leukozytensubgruppen durchgeführt und das Ausmaß der Spaltbildung am Mikroskop histologisch untersucht. Die Isolierung der Leukozytenuntergruppen erfolgte aus Vollblut mittels physikalischer und immunologischer Verfahren. Insgesamt wurden folgende Zellpopulationen getestet: PMN (Granulozyten), PBMC (Monozyten und Lymphozyten), isolierten Monozyten, verschiedene Konzentrationsverhältnisse von PMN und PBMC sowie Gesamtleukozyten. Aus praktischen Gründen v. a. wegen des hierfür unverhältnismäßig großen Spenderblutbedarfs entschied ich mich nach einem Testlauf den Kryoschnitt-Assay mit isolierten Monozyten nicht weiter durchzuführen. Die Überprüfung der Reinheit der isolierten Leukozytenuntergruppen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS) und war zufriedenstellend. In der abschließenden mikroskopischen Auswertung

wurde die prozentuale dermo-epidermale Separation in Bezug auf die Gesamtlänge der dermo-epidermalen Junktionszone bestimmt und die gesammelten Ergebnisse auf die Werte der Positivkontrollen (Gesamtleukozyten) normiert. In dem verwendeten ex vivo Modell konnte ich erstmals mit statistischer Signifikanz zeigen, dass neben den PMN (Granulozyten) auch PBMC (Monozyten und Lymphozyten) eine dermo-epidermale Spaltbildung auslösen können. Außerdem deuten meine Ergebnisse aus dem Kryoschnitt-Assay auf eine verstärkende Interaktion zwischen den Leukozytenpopulationen untereinander. Jedoch muss v. a. dieser Punkt unbedingt mit anderen Experimenten genauer untersucht und erst noch bestätigt werden.

Im Anschluss an den Kryoschnitt-Assay untersuchte ich im Rahmen des ROS- und Zytokin-Assays, welche Entzündungsmediatoren von aktivierten PBMC bzw. Monozyten zur Auslösung der dermo-epidermalen Separation ausgeschüttet werden. Ich konnte deskriptiv zeigen, dass durch (EBA-) Immunkomplexe aktivierte PBMC bzw. Monozyten radikale Sauerstoffspezies und folgende drei Zytokine vermehrt freisetzen: Gro- α , IL-8 und TNF- α . Meine gewonnenen Erkenntnisse zu PBMC bzw. isolierten Monozyten bei der EBA und die bereits bekannten Daten von Liu et al., Ameglio et al. und Zentner et al. zu Granulozyten beim BP deuten an, dass erstens weitere Aspekte der Pathogenese des BP und der EBA eine hohe Kongruenz besitzen und dass zweitens isolierte Monozyten und Granulozyten im aktivierten Zustand auf ein ähnliches Entzündungsmediatorenprofil zurückgreifen. In weiterführenden Studien müssen meine Ergebnisse zunächst noch untermauert und vertieft werden.

Meine Arbeit unterstreicht die wichtige Rolle der Granulozyten (PMN) und liefert neue Tendenzen und Erkenntnisse über die Rolle von PBMC und Monozyten in der Pathogenese des BP und der EBA. Außerdem bestätigen meine Ergebnisse bereits bekannte Gemeinsamkeiten in der Pathogenese der bullösen Autoimmundermatosen und weisen auf weitere hin.

6 Literaturverzeichnis

1. Theofilopoulos AN. The basis of autoimmunity: Part I. Mechanisms of aberrant self-recognition. *Immunol Today* 1995; **16**(2): 90-8.
2. Sitaru C, Chiriac MT, Mihai S, Buning J, Gebert A, Ishiko A *et al.* Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice. *J Immunol* 2006; **177**(5): 3461-8.
3. Schmidt E, Zillikens D. Diagnosis and treatment of patients with autoimmune bullous disorders in Germany. *Dermatol Clin* 2011; **29**(4): 663-71.
4. Schmidt E. [Optimizing therapy in patients with severe autoimmune blistering skin diseases]. *Hautarzt* 2009; **60**(8): 633-40.
5. Schmidt E, Zillikens D. Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. *Autoimmun Rev* 2010; **10**(2): 84-9.
6. Ishii N, Hamada T, Dainichi T, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S *et al.* Epidermolysis bullosa acquisita: what's new? *J Dermatol* 2010; **37**(3): 220-30.
7. Amagai M, Karpati S, Prussick R, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J Clin Invest* 1992; **90**(3): 919-26.
8. Bystryn JC, Rudolph JL. Pemphigus. *Lancet* 2005; **366**(9479): 61-73.
9. Amagai M. Autoantibodies against cell adhesion molecules in pemphigus. *J Dermatol* 1994; **21**(11): 833-7.
10. Rose C, Brocker EB, Zillikens D. [Relevance of histological examination in the diagnosis of autoimmune bullous dermatoses]. *J Dtsch Dermatol Ges* 2004; **2**(2): 96-104.
11. Bertram F, Brocker EB, Zillikens D, Schmidt E. Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009; **7**(5): 434-40.
12. Schmidt E, Zillikens D. Research in practice: diagnosis of subepidermal autoimmune bullous disorders. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009; **7**(4): 296-300.
13. Sitaru C, Goebeler M, Zillikens D. [Bullous autoimmune dermatoses (I): Pathogenesis and diagnosis]. *J Dtsch Dermatol Ges* 2004; **2**(2): 123-8; quiz 139-40.
14. Schmidt E, Zillikens D. Pemphigoid diseases. *Lancet* 2013; **381**(9863): 320-32.

15. Marazza G, Pham HC, Scharer L, Pedrazzetti PP, Hunziker T, Trueb RM *et al.* Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study. *Br J Dermatol* 2009; **161**(4): 861-8.
16. Kippes W, Schmidt E, Roth A, Rzany B, Brocker EB, Zillikens D. [Immunopathologic changes in 115 patients with bullous pemphigoid]. *Hautarzt* 1999; **50**(12): 866-72.
17. Joly P. Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris. *BMJ* 2008; **337**: a209.
18. Bernard P, Vaillant L, Labeille B, Bedane C, Arbeille B, Denoeux JP *et al.* Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group. *Arch Dermatol* 1995; **131**(1): 48-52.
19. Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJ, West J. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ* 2008; **337**: a180.
20. Zillikens D, Wever S, Roth A, Weidenthaler-Barth B, Hashimoto T, Brocker EB. Incidence of autoimmune subepidermal blistering dermatoses in a region of central Germany. *Arch Dermatol* 1995; **131**(8): 957-8.
21. Mulyowa GK, Jaeger G, Kabakyenga J, Brocker EB, Zillikens D, Schmidt E. Autoimmune subepidermal blistering diseases in Uganda: correlation of autoantibody class with age of patients. *Int J Dermatol* 2006; **45**(9): 1047-52.
22. Jung M, Kippes W, Messer G, Zillikens D, Rzany B. Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence. *J Am Acad Dermatol* 1999; **41**(2 Pt 1): 266-8.
23. Diaz LA, Rattie H, 3rd, Saunders WS, Futamura S, Squiquera HL, Anhalt GJ *et al.* Isolation of a human epidermal cDNA corresponding to the 180-kD autoantigen recognized by bullous pemphigoid and herpes gestationis sera. Immunolocalization of this protein to the hemidesmosome. *J Clin Invest* 1990; **86**(4): 1088-94.
24. Bieber K, Sun S, Ishii N, Kasperkiewicz M, Schmidt E, Hirose M *et al.* Animal models for autoimmune bullous dermatoses. *Exp Dermatol* 2010; **19**(1): 2-11.
25. Georgi M, Jainta S, Brocker EB, Zillikens D. [Autoantigens of subepidermal bullous autoimmune dermatoses]. *Hautarzt* 2001; **52**(12): 1079-89.
26. Borradori L, Sonnenberg A. Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol* 1999; **112**(4): 411-8.
27. Lever WF. Pemphigus. *Medicine (Baltimore)* 1953; **32**(1): 1-123.

28. Jordon RE, Beutner EH, Witebsky E, Blumental G, Hale WL, Lever WF. Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. *JAMA* 1967; **200**(9): 751-6.
29. Liu Z, Sui W, Zhao M, Li Z, Li N, Thresher R *et al.* Subepidermal blistering induced by human autoantibodies to BP180 requires innate immune players in a humanized bullous pemphigoid mouse model. *J Autoimmun* 2008; **31**(4): 331-8.
30. Schmidt E, della Torre R, Borradori L. Clinical features and practical diagnosis of bullous pemphigoid. *Dermatol Clin* 2011; **29**(3): 427-38, viii-ix.
31. Ghohestani RF, Cozzani E, Delaporte E, Nicolas JF, Parodi A, Claudy A. IgE antibodies in sera from patients with bullous pemphigoid are autoantibodies preferentially directed against the 230-kDa epidermal antigen (BP230). *J Clin Immunol* 1998; **18**(3): 202-9.
32. Schmidt E, Brocker EB, Zillikens D. [New aspects on the pathogenesis of bullous pemphigoid]. *Hautarzt* 2000; **51**(9): 637-45.
33. Zillikens D, Giudice GJ. BP180/type XVII collagen: its role in acquired and inherited disorders of the dermal-epidermal junction. *Arch Dermatol Res* 1999; **291**(4): 187-94.
34. Masunaga T, Shimizu H, Yee C, Borradori L, Lazarova Z, Nishikawa T *et al.* The extracellular domain of BPAG2 localizes to anchoring filaments and its carboxyl terminus extends to the lamina densa of normal human epidermal basement membrane. *J Invest Dermatol* 1997; **109**(2): 200-6.
35. Zillikens D. Acquired skin disease of hemidesmosomes. *J Dermatol Sci* 1999; **20**(2): 134-54.
36. Chimanovitch I, Schmidt E, Messer G, Dopp R, Partscht K, Brocker EB *et al.* IgG1 and IgG3 are the major immunoglobulin subclasses targeting epitopes within the NC16A domain of BP180 in pemphigoid gestationis. *J Invest Dermatol* 1999; **113**(1): 140-2.
37. Chimanovitch I, Hamm H, Georgi M, Kroiss M, Stolz W, Apitz C *et al.* Bullous pemphigoid of childhood: autoantibodies target the same epitopes within the NC16A domain of BP180 as autoantibodies in bullous pemphigoid of adulthood. *Arch Dermatol* 2000; **136**(4): 527-32.
38. Zillikens D, Rose PA, Balding SD, Liu Z, Olague-Marchan M, Diaz LA *et al.* Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. *J Invest Dermatol* 1997; **109**(4): 573-9.
39. Dopp R, Schmidt E, Chimanovitch I, Leverkus M, Brocker EB, Zillikens D. IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in Bullous pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *J Am Acad Dermatol* 2000; **42**(4): 577-83.

40. Perriard J, Jaunin F, Favre B, Budinger L, Hertl M, Saurat JH *et al.* IgG autoantibodies from bullous pemphigoid (BP) patients bind antigenic sites on both the extracellular and the intracellular domains of the BP antigen 180. *J Invest Dermatol* 1999; **112**(2): 141-7.
41. Ludwig RJ, Recke A, Bieber K, Muller S, Marques Ade C, Banczyk D *et al.* Generation of antibodies of distinct subclasses and specificity is linked to H2s in an active mouse model of epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol* 2011; **131**(1): 167-76.
42. Iwata H, Bieber K, Tiburzy B, Chrobok N, Kalies K, Shimizu A *et al.* B cells, dendritic cells, and macrophages are required to induce an autoreactive CD4 helper T cell response in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Immunol* 2013; **191**(6): 2978-88.
43. Budinger L, Borradori L, Yee C, Eming R, Ferencik S, Grosse-Wilde H *et al.* Identification and characterization of autoreactive T cell responses to bullous pemphigoid antigen 2 in patients and healthy controls. *J Clin Invest* 1998; **102**(12): 2082-9.
44. Chomarat P, Banchereau J. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *Int Rev Immunol* 1998; **17**(1-4): 1-52.
45. Gammon WR, Merritt CC, Lewis DM, Sams WM, Jr., Carlo JR, Wheeler CE, Jr. An in vitro model of immune complex-mediated basement membrane zone separation caused by pemphigoid antibodies, leukocytes, and complement. *J Invest Dermatol* 1982; **78**(4): 285-90.
46. Jordon RE, Kawana S, Fritz KA. Immunopathologic mechanisms in pemphigus and bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 1985; **85**(1 Suppl): 72s-78s.
47. Chiriac MT, Roesler J, Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K, Zillikens D, Sitaru C. NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *J Pathol* 2007; **212**(1): 56-65.
48. Ameglio F, D'Auria L, Bonifati C, Ferraro C, Mastroianni A, Giacalone B. Cytokine pattern in blister fluid and serum of patients with bullous pemphigoid: relationships with disease intensity. *Br J Dermatol* 1998; **138**(4): 611-4.
49. Zentner A, Rendl J, Grelle I, Dummer R, Brocker EB, Zillikens D. Elevated levels of soluble tumour necrosis factor receptor I in blister fluids of bullous pemphigoid and suction blisters. *Arch Dermatol Res* 1994; **286**(6): 355-7.
50. Schmidt E, Reimer S, Kruse N, Jainta S, Brocker EB, Marinkovich MP *et al.* Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2000; **115**(5): 842-8.

51. Samavedam UK, Kalies K, Scheller J, Sadeghi H, Gupta Y, Jonkman MF *et al.* Recombinant IL-6 treatment protects mice from organ specific autoimmune disease by IL-6 classical signalling-dependent IL-1ra induction. *J Autoimmun* 2013; **40**: 74-85.
52. Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA *et al.* A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest* 1993; **92**(5): 2480-8.
53. Liu Z, Giudice GJ, Swartz SJ, Fairley JA, Till GO, Troy JL *et al.* The role of complement in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 1995; **95**(4): 1539-44.
54. Liu Z, Giudice GJ, Zhou X, Swartz SJ, Troy JL, Fairley JA *et al.* A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 1997; **100**(5): 1256-63.
55. Zhao M, Trimbeger ME, Li N, Diaz LA, Shapiro SD, Liu Z. Role of FcRs in animal model of autoimmune bullous pemphigoid. *J Immunol* 2006; **177**(5): 3398-405.
56. Veri MC, Gorlatov S, Li H, Burke S, Johnson S, Stavenhagen J *et al.* Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fcγ-receptor IIB (CD32B) from the activating Fcγ-receptor IIA (CD32A): biochemical, biological and functional characterization. *Immunology* 2007; **121**(3): 392-404.
57. Yu X, Holdorf K, Kasper B, Zillikens D, Ludwig RJ, Petersen F. FcγRIIA and FcγRIIIB are required for autoantibody-induced tissue damage in experimental human models of bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2010; **130**(12): 2841-4.
58. Schmidt E, Sitaru C, Schubert B, Wesselmann U, Kromminga A, Brocker EB *et al.* Subacute prurigo variant of bullous pemphigoid: autoantibodies show the same specificity compared with classic bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 2002; **47**(1): 133-6.
59. Korman N. Bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 1987; **16**(5 Pt 1): 907-24.
60. Wever S, Rank C, Hornschuh B, Hashimoto T, Nishikawa T, Brocker EB *et al.* [Bullous pemphigoid simulation subacute simple prurigo]. *Hautarzt* 1995; **46**(11): 789-95.
61. Hertl M, Schuler G. [Bullous autoimmune dermatoses. 1: Classification]. *Hautarzt* 2002; **53**(3): 207-19; quiz 220-1.
62. Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Fontao L, Calabresi V, Hofmann SC, Hellmark T *et al.* Multicenter prospective study of the humoral autoimmune response in bullous pemphigoid. *Clin Immunol* 2008; **128**(3): 415-26.

63. Vaillant L, Bernard P, Joly P, Prost C, Labeille B, Bedane C *et al.* Evaluation of clinical criteria for diagnosis of bullous pemphigoid. French Bullous Study Group. *Arch Dermatol* 1998; **134**(9): 1075-80.
64. Tran JT, Mutasim DF. Localized bullous pemphigoid: a commonly delayed diagnosis. *Int J Dermatol* 2005; **44**(11): 942-5.
65. Bourdon-Lanoy E, Roujeau JC, Joly P, Guillaume JC, Bernard P, Prost C *et al.* [Bullous pemphigoid in young patients: a retrospective study of 74 cases]. *Ann Dermatol Venereol* 2005; **132**(2): 115-22.
66. Langan SM, Groves RW, West J. The relationship between neurological disease and bullous pemphigoid: a population-based case-control study. *J Invest Dermatol* 2011; **131**(3): 631-6.
67. Chen J, Li L, Zeng Y, Xu H, Song Y, Wang B. Sera of elderly bullous pemphigoid patients with associated neurological diseases recognize bullous pemphigoid antigens in the human brain. *Gerontology* 2011; **57**(3): 211-6.
68. Seppanen A, Suuronen T, Hofmann SC, Majamaa K, Alafuzoff I. Distribution of collagen XVII in the human brain. *Brain Res* 2007; **1158**: 50-6.
69. Kelly SE, Wojnarowska F. The use of chemically split tissue in the detection of circulating anti-basement membrane zone antibodies in bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid. *Br J Dermatol* 1988; **118**(1): 31-40.
70. Charneux J, Lorin J, Vitry F, Antonicelli F, Reguiai Z, Barbe C *et al.* Usefulness of BP230 and BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assays in the initial diagnosis of bullous pemphigoid: a retrospective study of 138 patients. *Arch Dermatol* 2011; **147**(3): 286-91.
71. Schmidt E, Obe K, Brocker EB, Zillikens D. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 2000; **136**(2): 174-8.
72. Zillikens D, Mascaro JM, Rose PA, Liu Z, Ewing SM, Caux F *et al.* A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 1997; **109**(5): 679-83.
73. Sitaru C, Dahnrich C, Probst C, Komorowski L, Blocker I, Schmidt E *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies. *Exp Dermatol* 2007; **16**(9): 770-7.
74. Kromminga A, Sitaru C, Hagel C, Herzog S, Zillikens D. Development of an ELISA for the detection of autoantibodies to BP230. *Clin Immunol* 2004; **111**(1): 146-52.

75. Hofmann SC, Kautz O, Hertl M, Sticherling M, Zillikens D, Bruckner-Tuderman L. Results of a survey of German dermatologists on the therapeutic approaches to pemphigus and bullous pemphigoid. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009; **7**(3): 227-33.
76. Joly P, Roujeau JC, Benichou J, Picard C, Dreno B, Delaporte E *et al.* A comparison of oral and topical corticosteroids in patients with bullous pemphigoid. *N Engl J Med* 2002; **346**(5): 321-7.
77. Goebeler M, Sitaru C, Zillikens D. [Blistering autoimmune dermatoses (II): therapy]. *J Dtsch Dermatol Ges* 2004; **2**(9): 774-91; quiz 792-3.
78. Khumalo N, Kirtschig G, Middleton P, Hollis S, Wojnarowska F, Murrell D. Interventions for bullous pemphigoid. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; (3): CD002292.
79. Rzany B, Partscht K, Jung M, Kippes W, Mecking D, Baima B *et al.* Risk factors for lethal outcome in patients with bullous pemphigoid: low serum albumin level, high dosage of glucocorticosteroids, and old age. *Arch Dermatol* 2002; **138**(7): 903-8.
80. Wojnarowska F, Kirtschig G, Highet AS, Venning VA, Khumalo NP. Guidelines for the management of bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 2002; **147**(2): 214-21.
81. Beissert S, Werfel T, Frieling U, Bohm M, Sticherling M, Stadler R *et al.* A comparison of oral methylprednisolone plus azathioprine or mycophenolate mofetil for the treatment of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 2007; **143**(12): 1536-42.
82. Schmidt E, Kraensel R, Goebeler M, Sinkgraven R, Brocker EB, Rzany B *et al.* Treatment of bullous pemphigoid with dapsone, methylprednisolone, and topical clobetasol propionate: a retrospective study of 62 cases. *Cutis* 2005; **76**(3): 205-9.
83. Joly P, Roujeau JC, Benichou J, Delaporte E, D'Incan M, Dreno B *et al.* A comparison of two regimens of topical corticosteroids in the treatment of patients with bullous pemphigoid: a multicenter randomized study. *J Invest Dermatol* 2009; **129**(7): 1681-7.
84. Joly P, Benichou J, Lok C, Hellot MF, Saiag P, Tancrede-Bohin E *et al.* Prediction of survival for patients with bullous pemphigoid: a prospective study. *Arch Dermatol* 2005; **141**(6): 691-8.
85. Roujeau JC, Lok C, Bastuji-Garin S, Mhalla S, Enginger V, Bernard P. High risk of death in elderly patients with extensive bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 1998; **134**(4): 465-9.
86. Remington J, Chen M, Burnett J, Woodley DT. Autoimmunity to type VII collagen: epidermolysis bullosa acquisita. *Curr Dir Autoimmun* 2008; **10**: 195-205.

87. Le Roux-Villet C, Prost-Squarcioni C. [Epidermolysis bullosa acquisita: literature review]. *Ann Dermatol Venereol* 2011; **138**(3): 228-46.
88. Roenigk HH, Jr., Ryan JG, Bergfeld WF. Epidermolysis bullosa acquisita. Report of three cases and review of all published cases. *Arch Dermatol* 1971; **103**(1): 1-10.
89. Woodley DT, Briggaman RA, O'Keefe EJ, Inman AO, Queen LL, Gammon WR. Identification of the skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. *N Engl J Med* 1984; **310**(16): 1007-13.
90. Woodley DT, Burgeson RE, Lunstrum G, Bruckner-Tuderman L, Reese MJ, Briggaman RA. Epidermolysis bullosa acquisita antigen is the globular carboxyl terminus of type VII procollagen. *J Clin Invest* 1988; **81**(3): 683-7.
91. Keene DR, Sakai LY, Lunstrum GP, Morris NP, Burgeson RE. Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J Cell Biol* 1987; **104**(3): 611-21.
92. Shimizu H, Ishiko A, Masunaga T, Kurihara Y, Sato M, Bruckner-Tuderman L *et al.* Most anchoring fibrils in human skin originate and terminate in the lamina densa. *Lab Invest* 1997; **76**(6): 753-63.
93. Lapiere JC, Woodley DT, Parente MG, Iwasaki T, Wynn KC, Christiano AM *et al.* Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. *J Clin Invest* 1993; **92**(4): 1831-9.
94. Witebsky E. Concept of autoimmune disease. *Ann N Y Acad Sci* 1966; **135**(1): 443-50.
95. Woodley DT, Ram R, Doostan A, Bandyopadhyay P, Huang Y, Remington J *et al.* Induction of epidermolysis bullosa acquisita in mice by passive transfer of autoantibodies from patients. *J Invest Dermatol* 2006; **126**(6): 1323-30.
96. Sitaru C, Mihai S, Otto C, Chiriac MT, Hausser I, Dotterweich B *et al.* Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *J Clin Invest* 2005; **115**(4): 870-8.
97. Ludwig RJ. Model systems duplicating epidermolysis bullosa acquisita: a methodological review. *Autoimmunity* 2012; **45**(1): 102-10.
98. Ludwig RJ. Clinical Presentation, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Epidermolysis Bullosa Acquisita. *ISRN Dermatology* 2013; **2013**: 25.
99. Sitaru C. Experimental models of epidermolysis bullosa acquisita. *Exp Dermatol* 2007; **16**(6): 520-31.
100. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol* 1958; **20**(1-4): 156-66.

101. Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P, Plenge RM *et al.* Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS Genet* 2008; **4**(4): e1000024.
102. Sitaru AG, Sesarman A, Mihai S, Chiriac MT, Zillikens D, Hultman P *et al.* T cells are required for the production of blister-inducing autoantibodies in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Immunol* 2010; **184**(3): 1596-603.
103. Ludwig RJ, Muller S, Marques A, Recke A, Schmidt E, Zillikens D *et al.* Identification of quantitative trait loci in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol* 2012; **132**(5): 1409-15.
104. Sitaru C, Kromminga A, Hashimoto T, Brocker EB, Zillikens D. Autoantibodies to type VII collagen mediate Fc γ -dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *Am J Pathol* 2002; **161**(1): 301-11.
105. Shimanovich I, Mihai S, Oostingh GJ, Ilenchuk TT, Brocker EB, Opdenakker G *et al.* Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *J Pathol* 2004; **204**(5): 519-27.
106. Mihai S, Chiriac MT, Takahashi K, Thurman JM, Holers VM, Zillikens D *et al.* The alternative pathway of complement activation is critical for blister induction in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Immunol* 2007; **178**(10): 6514-21.
107. Mooney E, Falk RJ, Gammon WR. Studies on complement deposits in epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 1992; **128**(1): 58-60.
108. Gammon WR, Briggaman RA, Woodley DT, Heald PW, Wheeler CE, Jr. Epidermolysis bullosa acquisita--a pemphigoid-like disease. *J Am Acad Dermatol* 1984; **11**(5 Pt 1): 820-32.
109. Gammon WR, Briggaman RA, Wheeler CE, Jr. Epidermolysis bullosa acquisita presenting as an inflammatory bullous disease. *J Am Acad Dermatol* 1982; **7**(3): 382-7.
110. Hoshina D, Sawamura D, Nomura T, Tanimura S, Abe M, Onozuka T *et al.* Epidermolysis bullosa acquisita associated with psoriasis vulgaris. *Clin Exp Dermatol* 2007; **32**(5): 516-8.
111. Labeille B, Gineston JL, Denoeux JP, Capron JP. Epidermolysis bullosa acquisita and Crohn's disease. A case report with immunological and electron microscopic studies. *Arch Intern Med* 1988; **148**(6): 1457-9.
112. Woodley DT, Briggaman RA, Gammon WR. Acquired epidermolysis bullosa. A bullous disease associated with autoimmunity to type VII (anchoring fibril) collagen. *Dermatol Clin* 1990; **8**(4): 717-26.

113. Chen M, Chan LS, Cai X, O'Toole EA, Sample JC, Woodley DT. Development of an ELISA for rapid detection of anti-type VII collagen autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol* 1997; **108**(1): 68-72.
114. Amagai M, Ikeda S, Shimizu H, Iizuka H, Hanada K, Aiba S *et al.* A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2009; **60**(4): 595-603.
115. Sesarman A, Sitaru AG, Olaru F, Zillikens D, Sitaru C. Neonatal Fc receptor deficiency protects from tissue injury in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Mol Med (Berl)* 2008; **86**(8): 951-9.
116. Daoud YJ, Amin KG. Comparison of cost of immune globulin intravenous therapy to conventional immunosuppressive therapy in treating patients with autoimmune mucocutaneous blistering diseases. *Int Immunopharmacol* 2006; **6**(4): 600-6.
117. Ishii N, Hashimoto T. [High-dose intravenous immunoglobulin (IVIg) for autoimmune bullous diseases]. *Arerugi* 2010; **59**(12): 1605-9.
118. Schmidt E, Zillikens D. Immunoabsorption in dermatology. *Arch Dermatol Res* 2010; **302**(4): 241-53.
119. Shimanovich I, Herzog S, Schmidt E, Opitz A, Klinker E, Brocker EB *et al.* Improved protocol for treatment of pemphigus vulgaris with protein A immunoabsorption. *Clin Exp Dermatol* 2006; **31**(6): 768-74.
120. Zillikens D, Derfler K, Eming R, Fierlbeck G, Goebeler M, Hertl M *et al.* Recommendations for the use of immunoapheresis in the treatment of autoimmune bullous diseases. *J Dtsch Dermatol Ges* 2007; **5**(10): 881-7.
121. Nagel A, Hertl M, Eming R. B-cell-directed therapy for inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 2009; **129**(2): 289-301.
122. Schmidt E, Hunzelmann N, Zillikens D, Brocker EB, Goebeler M. Rituximab in refractory autoimmune bullous diseases. *Clin Exp Dermatol* 2006; **31**(4): 503-8.
123. Schmidt E, Benoit S, Brocker EB, Zillikens D, Goebeler M. Successful adjuvant treatment of recalcitrant epidermolysis bullosa acquisita with anti-CD20 antibody rituximab. *Arch Dermatol* 2006; **142**(2): 147-50.
124. Shimanovich I, Nitschke M, Rose C, Grabbe J, Zillikens D. Treatment of severe pemphigus with protein A immunoabsorption, rituximab and intravenous immunoglobulins. *Br J Dermatol* 2008; **158**(2): 382-8.
125. Hertl M, Zillikens D, Borradori L, Bruckner-Tuderman L, Burckhard H, Eming R *et al.* Recommendations for the use of rituximab (anti-CD20 antibody) in the treatment of autoimmune bullous skin diseases. *J Dtsch Dermatol Ges* 2008; **6**(5): 366-73.

126. Niedermeier A, Eming R, Pfütze M, Neumann CR, Happel C, Reich K *et al.* Clinical response of severe mechanobullous epidermolysis bullosa acquisita to combined treatment with immunoadsorption and rituximab (anti-CD20 monoclonal antibodies). *Arch Dermatol* 2007; **143**(2): 192-8.
127. Sitaru C, Schmidt E, Petermann S, Munteanu LS, Brocker EB, Zillikens D. Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *J Invest Dermatol* 2002; **118**(4): 664-71.
128. Liu Z, Roopenian DC, Zhou X, Christianson GJ, Diaz LA, Sedmak DD *et al.* Beta2-microglobulin-deficient mice are resistant to bullous pemphigoid. *J Exp Med* 1997; **186**(5): 777-83.
129. Recke A, Sitaru C, Vidarsson G, Evensen M, Chiriac MT, Ludwig RJ *et al.* Pathogenicity of IgG subclass autoantibodies to type VII collagen: induction of dermal-epidermal separation. *J Autoimmun* 2010; **34**(4): 435-44.

7 Anhang

Abkürzungen

BMZ	Basalmembranzzone
BP	bullöses Pemphigoid
BP180	180 kDa schweres bullöses Pemphigoid Antigen (Typ XVII Kollagen)
BP230	230 kDa schweres bullöses Pemphigoid Antigen
CD	Cluster of Differentiation
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEJ	dermo-epidermale Junctionszone
DIF	direkte Immunfluoreszenz
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay; enzymatischer Immuntest
ESR	Erythrozytensedimentationsrate
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting; Durchflusszytometrie
g	relative Zentrifugalkraft
fMLP	formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
GK	Glukokortikoid
Gro- α	Growth-regulated-protein alpha (Wachstums-regulierendes Protein alpha)
H&E	Hämatoxylin-Eosin
I.E.	Internationale Einheiten
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
IL-8	Interleukin Nummer 8
IVIG	intravenöse Immunglobuline
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
mCol7	murines 290kD schwere Typ VII Kollagen
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
M	molar
NaCl	Natriumchlorid

NC1	Nicht-Kollagendomäne Nummer 1
NC16A	Nicht-Kollagendomäne Nummer 16A
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells; mononukleäre Leukozyten
PBS	phosphate-buffered saline
PMN	Polymorphonuclear Cells; polymorphkernige Leukozyten
Pred.äqu.	Prednisolonäquivalenzdosis
ROS	radikale Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha

Verwendete Laborgeräte

Airsterilisator US PATS	<i>Binder GmbH, Tuttlingen</i>
Analysenwaage Analytical Plus	<i>Ohaus Corporation, New Jersey, USA</i>
Begasungsbrutschrank	<i>Heraerus Instruments GmbH, Hanau</i>
Biophotometer 8,5 mm	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Bio Vortex V1	<i>lab4you GmbH, Berlin</i>
Eindeckautomat Leica CV 5030	<i>Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar</i>
Elektrische Feinwaage PT 150	<i>Sartorius AG, Göttingen</i>
Elektrische Feinwaage Analytical plus	<i>Ohaus Corp., NJ 07932, USA</i>
ELISA-Washer Columbus Pro	<i>Tecan Group Ltd., 8708 Männedorf, Schweiz</i>
ELISA-Reader Victor ³ 1420 Multilabel	<i>Perkin Elmer Massachusetts, USA</i>
Eppendorf Pipetten/ Multipipetten	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
FACS Calibur Flow Cytometer	<i>BD, San Jose, USA</i>
Feuchtigkeitskammer	<i>Werner Hassa GmbH, Lübeck</i>
Gefrierkombination (+ 4°C, -20 ° C)	<i>Liebherr International AG, Bulle, Schweiz</i>
Gefriertruhe C660 (-80 ° C)	<i>New Brunswick Scientific, England</i>
Kühlkammer	<i>Viessmann GmbH & Co. KG, Allendorf</i>
Kryostat Leica CM 3050 S	<i>Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar</i>
Laborabzug captairchem	<i>Erlab Laboreinrichtungen GmbH & Co.KG, Wangen</i>

MACS Separator	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland</i>
MACS Multistand	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland</i>
Magnetrührer IKA ® RH basic 2	<i>IKA ® Werke GmbH & Co. KG, Staufen</i>
Mikroskop Wilovert S	<i>Helmut Hund GmbH, Wetzlar</i>
Mikroskop Olympus BX40	<i>Olympus Deutschland GmbH, Hamburg</i>
Neubauer Zählkammer	<i>A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg</i>
pH-Meter ph526	<i>MultiCal WTW, Weilheim</i>
Pipettierhilfe, pipetus®-akku	<i>Hirschmann Laborgeräte GmbH&Co. KG, Eberstadt</i>
Schütteltisch Duomax 1030	<i>Heidolph Instruments, Nürnberg</i>
Schüttler TPM4 Sarstedt	<i>Sarstedt Inc., Newton, NC 28658 USA</i>
Sterilbank, Biowizard Kojair	<i>W. H. Mahl, Reinraumtechnik GmbH, Magdeburg</i>
Tischzentrifuge Biofuge pico	<i>Haereus Instruments GmbH, Hanau</i>
Vortex Genie 2	<i>Scientific Industries, Bohemia, New York, USA</i>
Wasserbad WTH 500	<i>Karl Hecht GmbH & Co., Sondheim</i>
Wasserstrahlpumpe	<i>Brand GmbH & Co. KG, Wertheim</i>
Zentrifuge, Varifuge 3.0 R	<i>Haereus Instruments GmbH, Hanau</i>

Verbrauchsmaterialien

Acetate Foil for Microtest Well Plates	<i>Sarstedt Inc., Newton, NC 28658 USA</i>
Aluminiumfolie Paclan	<i>A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg</i>
Aqua Spüllösung	<i>Deltaselect GmbH, Dreieich</i>
Centricon-Röhrchen 50 ml	<i>Millipore, Schwalbach</i>
Deckgläser 24 x 60 mm	<i>Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig</i>
Einbettungsmedium Tissue-Tek®	<i>Sakura Finetek Europe B.V., Zoulerwoude, Niederlande</i>
Einmal-Kanülen BD Microlance 3	<i>Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>
Einmal-Küvetten UVette	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>

Einmal-Skalpell	<i>Feather Safety Razor Co., LTD, Osaka, Japan</i>
Erlenmeyerkolben	<i>A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg</i>
Falcon-Röhrchen 15 ml, 50 ml	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
LIA Platte weiss 96K	<i>Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland</i>
MACS Separation Columns 25MS	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland</i>
Objektträger 26 x 76 mm/ca. 1mm	<i>Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg</i>
Objektträger SuperFrost /Plus	<i>Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig</i>
Ölstift, DAKO Pen	<i>DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark</i>
Parafilm M Laboratory Film	<i>Pechiney Plastic Packaging, Wisconsin, USA</i>
Perfusionsbesteck BD Valu-Set	<i>Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>
Reaktionsgefäße 1,0 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Serologische Pipetten 10 ml, 25 ml	<i>Sarstedt AG & Co. Nuembrecht</i>
Spritzen 20 ml (BD Discardit II)	<i>Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>
Styroporkasten	<i>Apotheke UKSH, Campus Lübeck</i>

Chemikalien und Farbstoffe

Ammoniak-Lösung	<i>Merck KGaA, Darmstedt</i>
Aqua dest.	<i>Apotheke UKSH, Campus Lübeck</i>
Dextran T 500	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	<i>Merck KGaA, Darmstedt</i>
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	<i>Merck KGaA, Darmstedt</i>
EDTA	<i>Merck KGaA, Darmstedt</i>
Eosin	<i>Merck KGaA, Darmstedt</i>
Essigsäure-Alkohol	<i>Merck KGaA, Darmstedt</i>
Ethanol 70 %	<i>Apotheke UKSH, Campus Lübeck</i>
Formaldehyd-Lösung 5 %	<i>Merck KGaA, Darmstedt</i>
Hämatoxylin	<i>Merck KGaA, Darmstedt</i>
Kaliumchlorid (K+Cl ⁻)	<i>Merck KGaA, Darmstedt</i>
Luminol	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>

Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Natriumchlorid (NaCl)	<i>J.T. Baker, Deventer-Holland</i>
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	<i>Merck KGaA, Darmstedt</i>
Natriumlauge (NaOH)	<i>Merck KGaA, Darmstedt</i>
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Salzsäure (HCl)	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Trypan Blue	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Xylol	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>

Puffer, Lösungen und Medien

Blockingpuffer	<i>PBS mit 1% biotin-freiem BSA und 0,05% Tween</i>
Carbonatpuffer	<i>Na₂CO₃, NaHCO₃, HCl</i>
CL-Medium	<i>RPMI-1640 ohne Phenolrot mit L-Glutamin mit 25mM HEPES + 1% FCS</i>
Dimethylsulfoxide minimum 99,5 % GC	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
D-PBS 1-fach	<i>8 g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 1,44 g/l Na₂ HPO₄, K₂HPO₄ in ddH₂O</i>
FACS-Puffer	<i>PBS, 0,5-1% BSA, 0,1% NaN₃ Natriumsäure</i>
MACS-Puffer	<i>PBS, 0,1%BSA, 2mM EDTA</i>
Polymorphprep 250 ml Box	<i>AXIS-SHIELD, Oslo, Norway</i>
RPMI 1640 Medium with L-Glutamine	<i>BioWhittaker, Lonza, Belgium</i>

Verwendete Pharmaka und Antikörper

Anti-human CD14 Microbeads	<i>Miltenyi Biotec Inc., CA, USA</i>
Antikörper IgG1	<i>hergestellt nach ¹²⁹</i>
Antigen hCo17 E-F	<i>hergestellt nach ¹²⁹</i>
Heparin-Natrium-25.000	<i>ratiopharm GmbH, Ulm</i>
fMLP	<i>BD Biosciences, CA,</i>

8 Danksagung

Ich danke Herrn Direktor Prof. Dr. med. D. Zillikens für die Möglichkeit meine Arbeit an der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck durchführen zu dürfen, sowie für die Bereitstellung des dermatologischen Forschungslabors.

Mein größter Dank gilt natürlich Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ludwig für die Überlassung des Themas, die Anregungen während der experimentellen Arbeit und der Erstellung der Arbeit sowie die Möglichkeit der Veröffentlichung meiner Ergebnisse.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Bullöse Autoimmundermatosen bedanken, die mir insbesondere während der Durchführung der Experimente immer hilfreich zu Seite standen und für eine tolle Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Mein besonderer Dank gilt hier Dr. Katerina Vafia und Dr. Unni Samavedam.

Außerdem möchte ich mich bei allen bedanken, die mich moralisch unterstützt und motiviert haben diese Arbeit erfolgreich zu beenden. Insbesondere geht hier mein Dank an Fräulein Sweta Shah.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Mama Alla und meinem Papa Michael, die immer für mich da sind und mich während meiner gesamten Studienzeit ausnahmslos unterstützt haben.

9 Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name	Andre Lunz
Geburtsdatum	01.07.1987
Geburtsort	Moskau
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Anschrift	Karlsbaderstr. 14 55122 Mainz
Mobil:	0049-173-7439671
Mail:	andre.lunz@medizin.uni-luebeck.de



Studium

bis heute	Dissertation an der Universität zu Lübeck unter Prof. Dr. med. Ralf Ludwig: „Untersuchung über den Einfluss verschiedener Leukozytenpopulationen in der Pathogenese des bullösen Pemphigoids und der Epidermolysis bullosa acquisita“
06/2014	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02/2013 bis 01/2014	Praktisches Jahr (Wahlfach Orthopädie) mit folgenden Auslandsaufenthalten: - University of California San Diego, USA - Training Hospital Taranaki New Plymouth, Neuseeland
08/2010 bis 06/2011	ERASMUS-Stipendium an der Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spanien
09/2009	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2008 Lübeck	Fortsetzung des Medizinstudiums an der Universität zu Lübeck
10/2007	Beginn des Medizinstudiums an der Philipps-Universität Marburg

Famulaturen

11/2012	Notaufnahme, Hospital Civil Fray, Guadalajara, Mexiko
09/2012	Neurochirurgie, Campus-Virchow-Klinik Charité, Berlin
09/2011	Radiologie, Praxis Dr. Hlawatsch, Bingen am Rhein
03/2011	Pädiatrie, Hospital Universitario Las Palmas, Spanien
02/2011	Dermatologie, Hospital Insular, Las Palmas de G.C., Spanien
02/2010	Anästhesiologie, Sana Kliniken Süd, Lübeck

Praktika und Grundwehrdienst

07/2007 bis 10/2007	Pflegepraktikum, Universitätsklinik Mainz
10/2006 bis 07/2007	Grundwehrdienst bei der Bundeswehr

Schulbildung

1998 bis 2006	Gymnasium Theresianum Mainz, Abitur
---------------	-------------------------------------

Besondere Kenntnisse

Sprachkenntnisse	Englisch:	Verhandlungssicher
	Spanisch:	Verhandlungssicher
	Russisch:	Verhandlungssicher
Ausbildung	staatlich anerkannter Tennistrainer	

Hobbys

Sportarten	Tennis (Oberligaspieler), Surfen, Joggen, Fitness
Musikinstrumente	Gitarre

Lübeck, den 05.12.2014

Andre Lunz

