

Aus dem Institut für Anatomie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

**Im aktiven Mausmodell der Epidermolysis bullosa
acquisita sind lymphonodale IFN- γ -Genexpression und
der MHC-Haplotyp H2s assoziiert mit der Ausbildung
pathogener, komplementfixierender Autoantikörper**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

– Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von
Matthias Christoph Hammers
aus Flensburg

Lübeck 2011

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

Tag der mündlichen Prüfung: 01.09.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 01.09.2011

Alles Wissen und alle Vermehrung des Wissens endet nicht mit einem Schlusspunkt, sondern mit Fragezeichen. Ein Plus an Wissen bedeutet ein Plus an Fragestellungen, und jede von ihnen wird immer wieder von neuen Fragestellungen abgelöst.

Hermann Hesse (1877-1962)

	Seite	
1	Einleitung	1
	Fragestellungen	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Versuchstiere	12
2.2	Immunisierung	12
2.3	Evaluation der Erkrankung	13
2.4	Organentnahme und Serumzentrifugation	14
2.5	Anfärbungen von Gefrierschnitten der Haut und des Lymphknotens	15
2.5.1	<i>Anfertigung von Gefrierschnitten</i>	15
2.5.2	<i>Verwendete Lösungen</i>	15
2.5.3	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	16
2.5.4	<i>Fluoreszenzfärbung von Gr-1 (Ly-6G und Ly-6C)</i>	17
2.5.5	<i>Fluoreszenzfärbungen von IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, C3</i>	17
2.5.6	<i>Fluoreszenzdoppelfärbung von CD138 und mCOL7C</i>	17
2.5.7	<i>Immunhistochemische Doppelfärbung von CD138 und mCOL7C</i>	18
2.5.8	<i>Immunhistochemische Anfärbung von Ki-67 und B220</i>	18
2.5.9	<i>Immunhistochemische Anfärbung von TCRβ-Ketten</i>	19
2.6	Auswertung der histologischen Präparate	19
2.7	Myeloperoxidase-Assay	20
2.8	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	20
2.9	RNA-Extraktion und cDNA-Synthese	22
2.10	Quantitative real-time PCR	23
2.11	Statistik	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Kinetik von Klinik, dermoepidermaler Komplementfixation, kutaner Granulozyteninfiltration und Myeloperoxidase-Aktivität	28
3.2	Kinetik mCOL7C-spezifischer Antikörper in Serum und Haut	30
3.3	Kinetik proliferierender T-Zellen und mCOL7C-spezifischer Plasmazellen des drainierenden Lymphknotens	32

3.4	Untersuchung des Th1-/Th2-Mikromilieus im drainierenden Lymphknoten	34
3.5	Untersuchung des Zusammenhanges H2s-Haplotyp – Th1-Polarisation – IgG2-Synthese – Erkrankung	36
3.6	Untersuchung der Expression von Fc γ -Rezeptoren in peripheren Leukozyten	38
4	Diskussion	39
4.1	Die Krankheitsprogression korreliert mit der Kinetik von dermoepidermaler C3-Fixation, Granulozyteninfiltration und MPO-Aktivität	39
4.2	Die beobachtbaren Kinetiken der Autoantikörper unterscheiden sich in Haut und Serum	41
4.3	Die zellulären Reaktionen des drainierenden Lymphknotens differieren in EBA-empfindlichen wie -resistenten Mäusen	42
4.4	EBA-Empfindlichkeit geht einher mit IFN- γ -Zytokingenexpression	44
4.5	Der MHC-Haplotyp H2s ist assoziiert mit EBA-Empfindlichkeit, dermoepidermaler Ablagerung komplementfixierender IgG2-Autoantikörper, T-Zellproliferation und IFN- γ -Zytokingenexpression	46
4.6	Der hochaffine Fc γ_1 -Rezeptor ist nur in Leukozyten EBA-empfindlicher SJL/J-Tiere stark exprimiert	48
5	Zusammenfassung	50
6	Literaturverzeichnis	51
7	Anhang	63
8	Danksagungen	67
9	Lebenslauf	68

APC	- Antigen Presenting Cell, antigenpräsentierende Zelle
C3	- Komplementfaktor C3
cDNA	- Complementary DNA, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CSR	- Class Switch Recombination, Klassenwechsel
Ct	- Cycle threshold
DAB	- Diaminobenzidin
DEJ	- Dermoepidermale Junktion
DIF	- Direkte Immunfluoreszenz
dsDNA	- Doppelsträngige DNA
EBA	- Epidermolysis bullosa acquisita
ELISA	- Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fc γ R	- Fc-Rezeptor, der den Fc-Teil eines IgG-Antikörpers bindet
FITC	- Fluoresceinisothiocyanat
HKG	- Housekeeping Gene
HLA	- Human Leukocyte Antigen, syn. MHC
IFN- γ	- Interferon- γ
IIF	- Indirekte Immunfluoreszenz
IL-4	- Interleukin-4
MAC	- Membrane Attack Complex
mCOL7C	- Immunodominantes Fragment der NC1-Domäne murinen Kollagen VII
MFI	- Mean Fluorescence Intensity
MHC	- Major Histocompatibility Complex, syn. HLA
MPO	- Myeloperoxidase
NC1	- Nichtkollagene Domäne 1
PBS	- Phosphate Buffered Saline
PCR	- Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
p. i.	- post injectionem, nach Injektion/Immunisierung
RNA	- Ribonukleinsäure
ROI	- Region Of Interest
SLE	- Systemischer Lupus erythematosus
SSS	- Salt-Split Skin
TCR	- T-Cell Receptor, T-Zellrezeptor
TBS	- TRIS-Buffered Saline
Tfh	- Follikuläre T-Helferzelle
Th1	- T-Helferzelle des Typs 1
Th2	- T-Helferzelle des Typs 2
Th17	- T-Helferzelle des Typs 17
Treg	- Regulatorische T-Zelle
TRIS	- Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1 Einleitung

Autoimmunerkrankungen stellen, mit Ausnahme der rheumatoiden Arthritis und der autoimmunen Thyreoiditis, im allgemeinen seltene Erkrankungen dar, die kumulativ jedoch fünf bis zehn Prozent der Bevölkerung westlicher Industrieländer betreffen (1, 2). Obwohl faszinierend, sind die einzelnen Erkrankungsentitäten selten im Detail untersucht und verstanden. Konsens besteht darin, dass die Anwesenheit von selbstreaktiven Lymphozyten und Antikörpern Vorbedingung für die Ausbildung von Autoimmunität – im Rahmen eines klinischen, meist chronischen Syndroms – ist. Im Vergleich zu B-Lymphozyten werden T-Lymphozyten als besonders prädestiniert für die Entstehung autoimmuner Erkrankungen angesehen, da sie sowohl die zelluläre wie humorale Immunabwehr aktiv beeinflussen können: Im Normalfall werden im Thymus von antigen-präsentierenden Zellen (Antigen Presenting Cells, APCs) zahlreiche körpereigene Antigene („Selbst-Antigene“) präsentiert und T-Zell-Klone mit zu hoher Affinität zum körpereigenen „Selbst“ deletiert (Prozess der negativen Selektion). Ein ähnlicher Prozess zur Toleranzentwicklung findet auch während der B-Zell-Reifung im Knochenmark statt. Diese Mechanismen der *zentralen Toleranz* sind jedoch regelhaft inkomplett und werden durch solche der *peripheren Toleranz* ergänzt: Autoreaktive T-Zellen können so durch Prozesse der Anergie (Ausbleiben der Aktivierung nach peripherer Antigenpräsentation durch fehlendes kostimulatorisches Signal, z. B. CD40 oder CD80), klonale Deletion (CD95-vermittelte Apoptose durch persistierende Aktivierung selbstreaktiver T-Zellen in der Peripherie) oder Suppression durch regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen können Effektor-T-Zellen z. B. durch Sekretion der Zytokine TGF- β oder IL-10 inhibieren) inaktiviert oder entfernt werden, während autoreaktive B-Zellen keine T-Zell-Hilfe erhalten und in der Regel schnell absterben (dies gilt nicht für B-1-Zellen, die ohne T-Zell-Hilfe niedrig affine IgM-Autoantikörper bilden können) (3, 4). Momentan wird in vielen Arbeiten, insbesondere in solchen zum extensiv untersuchten systemischen Lupus erythematosus (SLE), eine defekte periphere Toleranz als ausschlaggebend für die Entstehung von Autoimmunität angesehen: So sind die Mechanismen der zentralen Toleranz bei gesunden wie spontan an SLE erkrankten Mäusen gleich gut erhalten und in der Peripherie vor allem niedriger affine selbstreaktive B- und T-Zellen zu finden (5). Andere Studien

konnten zeigen, dass das naive periphere Lymphozytenrepertoire von Menschen wie Mäusen mit immunodominanten Autoantigenen stimuliert werden kann und die zentrale Toleranz dies nicht zu verhindern wusste (6, 7). Konsequenterweise erkannte man, dass ein geringer Grad an Autoimmunität gar physiologisch ist und dabei hilft, die normale Funktion des Immunsystems sicherzustellen (8). Lymphozyten unterscheiden nicht zwischen „selbst“ und „fremd“, sondern reagieren auf ein bestimmtes Antigen nur in einer bestimmten Umgebung, in einem definierten Mikromilieu (mit Zytokinen und/oder kostimulatorischen Signalen anderer Zellen) (9). Zu diesen Determinanten einer pathologischen Immunreaktion müssen auch genetische Einflüsse gerechnet werden, die bei den meisten Autoimmunerkrankungen multigener Natur sind: So bestehen nicht nur starke Assoziationen zu bestimmten Klasse I- und Klasse II-HLA-Molekülen*, sondern auch zu Genen, die beispielsweise Zytokine, Korezeptoren, Signalkaskadenbestandteile und apoptosefördernde wie -hemmende Proteine kodieren. Dabei kommt es weniger auf Mutationen in den jeweiligen Genen an, sondern auf die individuelle Kombination der möglichen Genvarianten (Allele), die zu einem für Autoimmunität empfänglicheren Phänotyp des Immunsystems führt (10-12). Der Auslöser autoimmuner Erkrankungen ist in den meisten Fällen unbekannt. Jedoch werden, epidemiologischen Erkenntnissen zufolge, Änderungen der Umgebungs- und Lebensbedingungen (z. B. bei Multipler Sklerose und Typ 1 Diabetes) und Exposition mit lokalen, auf bestimmte Regionen beschränkte Antigene (z. B. im Rahmen der endemischen Form des Pemphigus foliaceus, gen. Fogo selvagem) als mögliche Auslöser von Autoimmunität vermutet (13-16). Auch können Infektionen durch molekulare Mimikry des infektiösen Agens mit Epitopen körpereigener Proteine eine Autoimmunerkrankung triggern, so z. B. im Falle des rheumatischen Fiebers (Kreuzreaktion zwischen dem M-Protein β -hämolyzierender Streptokokken der Gruppe A und humanen Glykoproteinen in Herz, Gelenken und neuronalen Strukturen) oder des Guillain-Barré-Syndroms (Kreuzreaktivität von Lipopolysacchariden des Erregers *Campylobacter jejuni* und menschlichen Gangliosiden) (17-19). Zuletzt sollen in dieser Einführung nichtinfektiöse Auslöser Erwähnung finden: So können Fremdstoffe wie Penicilline und Cephalosporine als Haptene wirken und durch Bindung an Erythrozyten

* Human Leukocyte Antigen-Moleküle, syn. MHC- (Major Histocompatibility Complex-)Moleküle: Diese Komplexe der Antigenpräsentation werden kodiert in Klasse I- und Klasse II-Genen des Major Histocompatibility Complex-Lokus auf Chromosom 6 des Menschen.

Antikörper hervorrufen, die eine hämolytische Anämie bewirken. Das Antiarrhythmikum Procainamid kann in ähnlicher Art und Weise antinukleäre Antikörper und ein lupusähnliches Krankheitsbild hervorrufen (20).

Traditionell wird zwischen systemischen (z. B. SLE) und organspezifischen Autoimmunerkrankungen (z. B. Diabetes mellitus, Typ 1) unterschieden. Diese Einteilung erlaubt zwar keine Rückschlüsse auf die möglichen, bereits umrissenen kausalen Mechanismen, sie hat sich jedoch als klinisch sinnvoll erwiesen, zumal die genaue Ätiopathogenese der allermeisten Entitäten oft noch nicht bekannt ist (21). Dies gilt auch für die *bullösen Autoimmundermatosen*, die klassischerweise zu den organspezifischen Erkrankungen gerechnet werden. Bekannt ist, dass sich hier die pathologische Immunreaktion gegen Adhäsionsproteine der Haut und Schleimhäute richtet (3, 22-36). Nach dem Ort dieser antikörpervermittelten Reaktion kann man Krankheiten der Pemphigusgruppe mit *intraepidermalem Adhäsionsverlust* (Akantholyse) von solchen mit *subepidermalem Adhäsionsverlust* (Pemphigoide, Dermatitis herpetiformis, Epidermolysis bullosa acquisita) differenzieren (Tab. 1). Die schematische Darstellung der desmosomalen Zell-Zell-Kontakte von Keratinozyten (intraepidermal) und der hemidesmosomalen Kontakte zwischen basalen Keratinozyten und der Basalmembran (subepidermal) veranschaulicht den Ort des Adhäsionsverlustes nach Autoantikörperbildung und -bindung an die jeweiligen Antigene (Abb. 1).

Entität	Zielautoantigen(e)	DIF*-Befund	IIF [#] -Befund (Substrat)
Intraepidermaler Adhäsionsverlust (Pemphigusgruppe)			
Pemphigus vulgaris	Dsg [§] 1, Dsg 3	IgG und C3 interzellulär	IgG interzellulär (Affenösohagus)
Pemphigus foliaceus	Dsg 1	IgG und C3 interzellulär	IgG interzellulär (Affenösohagus)
Paraneoplastischer Pemphigus	Dsg 1, Dsg 3, Plakine	IgG und C3 interzellulär und dermoepidermal	IgG interzellulär (Rattenblase)
IgA-Pemphigus	Dsc [¶] 1, Dsg 3	IgA und C3 interzellulär	IgA interzellulär (Affenösohagus)
Subepidermaler Adhäsionsverlust			
Pemphigoidgruppe			
Bullöses Pemphigoid	BP180, BP230	IgG und C3 linear dermoepidermal	IgG epidermal (SSS [†])
Pemphigoid gestationis	BP180, BP230	C3 linear dermoepidermal	Komplementfixierende IgG epidermal (SSS)
Schleimhaut-pemphigoid	BP180, Laminin 5, $\alpha_6\beta_4$ -Integrin	IgG/IgA/C3 linear dermoepidermal	IgG/IgA epidermal/ dermal (SSS)
Lineare IgA-Dermatose	LAD-1 [‡]	IgA und C3 linear dermoepidermal	IgA epidermal/dermal (SSS)
Dermatitis herpetiformis Duhring	Transglutaminase	IgA granulär an den dermalen Papillae	IgA gegen Endomysium (Affenösohagus)
Epidermolysis bullosa acquisita (EBA)	Kollagen VII	IgG und C3 linear dermoepidermal	IgG dermal (SSS)

Tabelle 1 – Zielantigene und ausgewählte diagnostische Kriterien bullöser Autoimmundermatosen. Legende: *Direkte Immunfluoreszenz (IF); [#]Indirekte IF; [§]Desmoglein; [¶]Desmocollin; [†]NaCl-separierte humane Haut (Salt Split Skin, SSS); [‡]Linear IgA bullous dermatosis-Antigen 1; verändert nach (37)

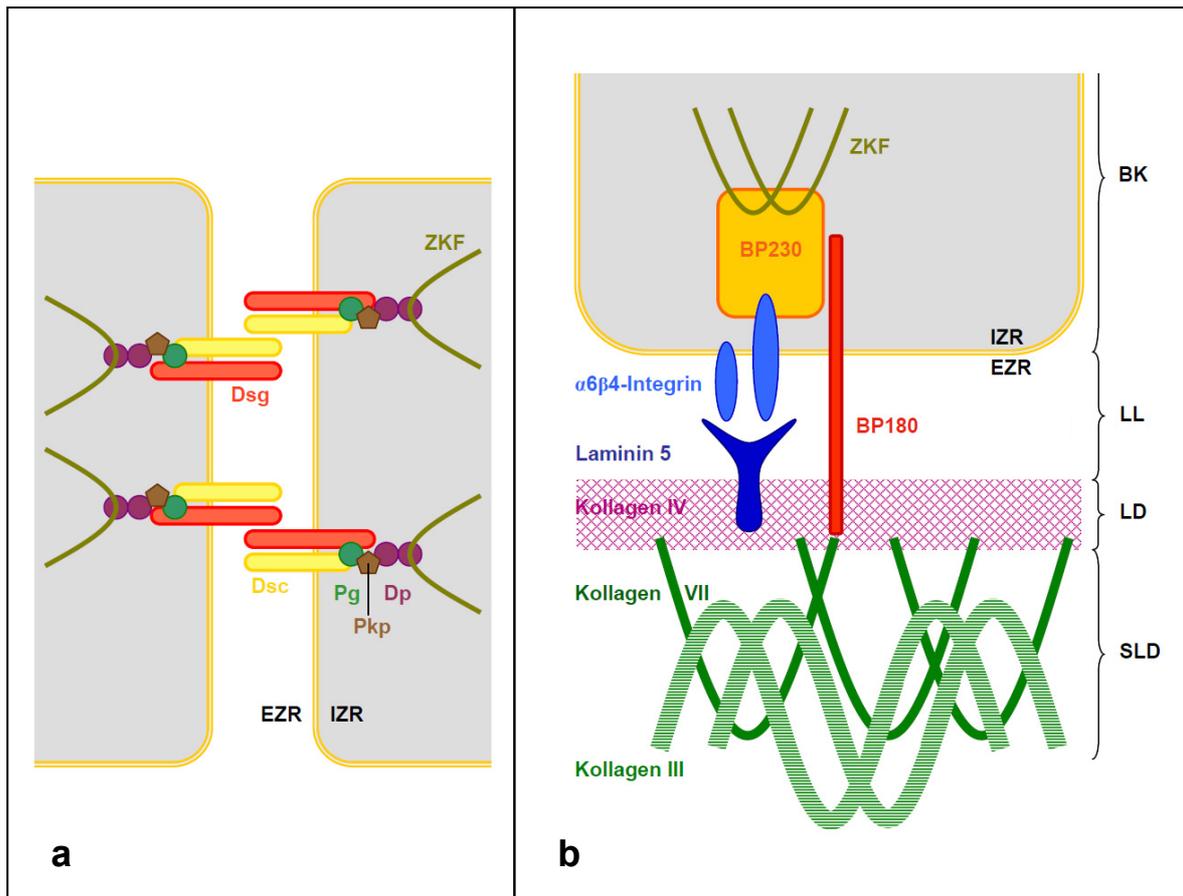


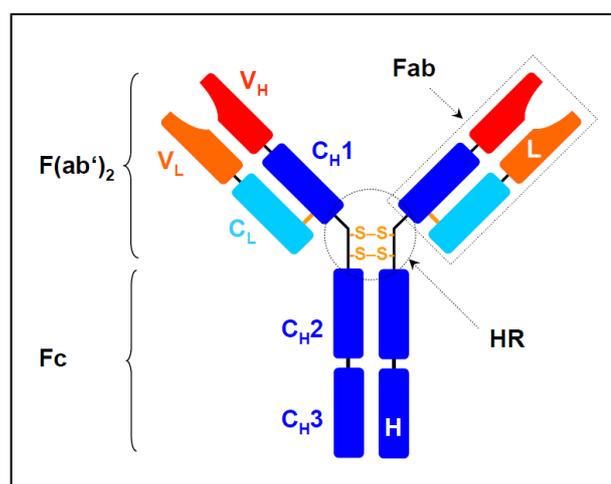
Abbildung 1 – Schematische Darstellung der intraepithelialen, desmosomalen (a) und der dermoepidermalen, hemidesmosomalen (b) Antigene ausgewählter bullöser Autoimmundermatosen. Die desmosomalen Transmembranproteine Desmoglein (Dsg) und Desmocollin (Dsc) gehören zur Großfamilie der Cadherine (Ca^{2+} -dependent adhesion molecules) und binden an Cadherine der Nachbarzelle. Die Transmembranproteine des Hemidesmosoms sind das $\alpha6\beta4$ -Integrin und das Kollagen XVII (BP180). Besonders viele Adhäsionskontakte finden sich in mechanisch belasteten Geweben (z. B. mehrschichtigen Plattenepithelien). Die Lamina densa (LD) der Basalmembranzzone (BMZ) ist ein räumliches Netz aus Kollagen IV-Molekülen und den hier nicht dargestellten Proteinen und Proteoglykanen Nidogen und Perlecan. Die LD gewinnt durch Ankerfibrillen aus Kollagen VII Anschluss an Kollagen III-Fibrillen aus dem Stratum papillare des Coriums (38).
 Legende: Pg: Plakoglobin; Pkp: Plakophilin; Dp: Desmoplakin; ZKF: Zytokeratinfilament; EZR: Extrazellulärraum; IZR: Intrazellulärraum; BK: Basaler Keratinozyt; LL: Lamina lucida der BMZ; SLD: Sublamina densa der BMZ; modifiziert nach (39-41)

Neben der Klinik ist für die Diagnosestellung bullöser Autoimmundermatosen eine Hautbiopsie und Blutentnahme erforderlich: Für die histologische Routinefärbung mit Hämatoxylin und Eosin verwendet man idealerweise das Gewebe einer in toto exzidierten Blase, welche zwar Aussagen über eine intra- oder subepidermale Spaltbildung zulässt, jedoch keine über eine autoimmune Natur der Erkrankung. Um gebundene und zirkulierende Autoantikörper nachzuweisen, bedient man sich daher der Techniken der direkten und indirekten Immunfluoreszenz (DIF, IIF): Für die DIF verwendet man eine perilesionale Hautbiopsie, färbt mit

fluorochromkonjugierten Antikörpern die abgelagerten Antikörper an und kann, je nach Reaktionsmuster, eine spezifische Aussage zu der Erkrankung treffen (vgl. Tab. 1). Mit der Methode der IIF können Serumantikörper des jeweiligen Patienten nachgewiesen und die bullösen Autoimmundermatosen mit subepidermaler Spaltbildung besser differenziert werden: Hierzu gibt man das Patientenserum zu (zuvor in NaCl-Lösung separierter) humaner Spalthaut gesunder Patienten und kann durch den festgestellten Ort der Antikörperbindung zusätzliche Informationen zur differentialdiagnostischen Abwägung gewinnen (sog. Salt Split Skin-Methode, vgl. Tab. 1). Die molekulare Spezifität der zirkulierenden Antikörper kann abschließend durch ELISA oder Immunoblotting geklärt werden (37, 42).

Die Mechanismen der durch Autoantikörperbindung an die Antigene der Haut hervorgerufenen Immunpathologien sind Gegenstand intensiver Diskussion: Antikörper werden als Produkt einer adaptiven Immunantwort von Plasmablasten und langlebigen Plasmazellen sezerniert und üben im Rahmen der physiologischen Immunabwehr verschiedene, von der Struktur des Antikörpers abhängige Funktionen aus. Die variablen Bereiche des $F(ab')_2$ -Teils von Antikörpern können das Pathogen neutralisieren und agglutinieren, während über den konstanten Fc-Teil des Antikörpers Effektorfunktionen wie Opsonisation, Komplementaktivierung und Bindung an leukozytäre Fc-Rezeptoren vermittelt werden (vgl. Abb. 2). In einer autoimmunen Situation können gebundene Antikörper über die variablen Bereiche direkte Mechanismen wie sterische

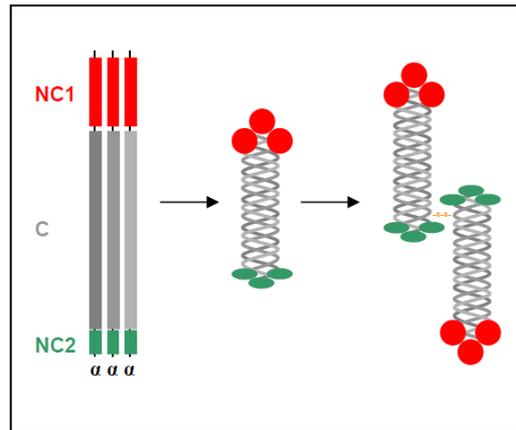
Abbildung 2 – Prototyp eines IgG-Antikörpers: Zwei identische schwere Ketten (heavy chain, H) sind über Disulfidbrücken miteinander und mit zwei identischen leichten Ketten (light chain, L) verbunden. Jede Kette besteht aus variablen (V) und konstanten (C) Regionen. Die V-Region erkennt das Antigen (Vermittlung von Spezifität), die C-Region der H-Kette bestimmt die Effektorfunktion. Die Sequenz der konstanten Regionen von H bestimmt die Klasse (IgM, IgD, IgG, IgA, IgE). Eine Gelenkregion (hinge region, HR) weisen nur IgG, IgD und IgA auf, IgE und IgM besitzen stattdessen eine weitere konstante Domäne C_H . Durch Verdau mit Pepsin erhält man das $F(ab')_2$ -Fragment und Fragmente des Fc-Teils. Papainverdau liefert zwei Fab-Fragmente und das Fc-Fragment. Reduktion mit Mercaptoethanol liefert zwei H- und L-Ketten. Verändert nach (43)



Behinderung, Initiation einer Signaltransduktion und Katalyse einer Oxidation von Wasser zu reaktiven Sauerstoffspezies ausüben (teilweise nachgewiesene Prozesse bei Pemphigus und Schleimhautpemphigoid), während sich die Funktionen des konstanten Fc-Teils mit Komplementaktivierung und Bindung an Fc-Rezeptoren von Leukozyten nicht von denen in einer physiologischen Immunantwort unterscheiden (nachgewiesen bei linearer IgA-Dermatose und Epidermolysis bullosa acquisita, EBA) (44-57).

Die EBA stellt im Formenkreis der bullösen Autoimmundermatosen eine chronisch verlaufende Erkrankung mit subepidermaler Blasenbildung, zirkulierenden und dermoepidermal gebundenen Autoantikörpern gegen einen Bestandteil der Basallamina dar und gehört mit einer Inzidenz von ca. 0,5/Mio. Einwohner zu den seltenen blasenbildenden Erkrankungen. Die ersten Fälle wurden bereits 1895 und 1904 von Elliot und Kablitz beschrieben. Klinisch heterogen, können die Patienten nichtentzündliche oder entzündliche Phänotypen sowie Mischformen dieser Präsentationen aufweisen: Während die nichtentzündliche Form mit mechanisch induzierter Bildung straffer Blasen an den Streckseiten der Extremitäten und Narben- und Milienbildung einhergeht, zeigt die entzündliche Variante Ähnlichkeiten zum bullösen Pemphigoid, der linearen IgA-Dermatose und dem Schleimhautpemphigoid. EBA betrifft typischerweise den Erwachsenen, jedoch gibt es vereinzelte Berichte über jugendliche Patienten (58-66). Eine immunogenetische Assoziation zum HLA-DR2-Haplotyp, der sich auch in SLE-Patienten findet, wurde in 29 Patienten beschrieben (67). In der DIF finden sich dermoepidermal Ablagerungen von IgG-Antikörpern und Komplementfaktor C3, während die IIF eine dermale Bindung der zirkulierenden Antikörper an humane Spalthaut zeigt (vgl. Tab. 1). Ultrastrukturell zeigt sich eine Bindung der Autoantikörper im Bereich der Sublamina densa der Basallamina, im Immunoblot mit Extrakten humaner Dermis erkennen EBA-Seren das 290 kDa schwere Kollagen VII und präzipitieren dieses Protein aus humanen Keratinozyten- und Fibroblastenextrakten (36, 68, 69). Ausgehend von der Lamina densa bildet Kollagen VII im Bereich der Sublamina densa schleifenförmige Ankerfibrillen aus, die den Fasern des Kollagen III aus dem Stratum papillare als Haltestrukturen dienen und den Zusammenhalt von Epidermis und Dermis sicherstellen (vgl. Abb. 1 und 3). Genmutationen im Kollagen VII-kodierenden COL7A1-Gen führen beim

Abbildung 3 – Kollagen VII setzt sich aus drei identischen α -Ketten zusammen, die sich zu einer Triplehelix zusammenlagern: Jede α -Kette besteht aus einer zentralen Kollagendomäne (C), die von einer 145 kDa schweren aminoterminalen nichtkollagenen Domäne (NC1) und einer 30 kDa schweren carboxyterminalen Domäne (NC2) flankiert wird. Zwei Monomere formen unter proteolytischer Abspaltung eines C-terminalen Propeptids durch Bone Morphogenetic Protein 1 (hier nicht gezeigt) und anschließender Ausbildung von Disulfidbrücken ein antiparalleles Dimer. Verändert nach (70)



Menschen zu dem EBA-ähnlichen Krankheitsbild der Epidermolysis bullosa dystrophica, was die besondere biologische Relevanz dieses Strukturproteins veranschaulicht (70, 71). Autoantikörper der meisten EBA-Patientenseren erkennen Epitope der NC1-Domäne, selten werden jedoch auch solche der zentralen Kollagen- und NC2-Domäne erkannt (72-74). Als Bestätigung der Pathogenität dieser Antikörper (und der autoimmunen Natur der EBA) gilt, in Anlehnung an die durch Witebsky et al. modifizierte Postulate Robert Kochs[†], die erfolgreiche Reproduktion des Krankheitsbildes der EBA durch passiven Transfer polyklonaler Antikörper der Klasse IgG vom Menschen in die Maus. Auch zeigte sich, dass der passive Transfer von F(ab')₂-Fragmenten dieser IgG-Autoantikörper nicht zu subepidermaler Blasenbildung führt (75, 76). Bestätigung und Erweiterung erfuhren diese Befunde mit dem ex-vivo-Kryosektionsmodell: Hier inkubierte man Hautproben gesunder Probanden mit den Autoantikörpern von EBA-Patienten und setzte in einem zweiten Schritt eine Leukozytensuspension ebenfalls gesunder Probanden hinzu: Die nun beobachtete und gut reproduzierbare dermoepidermale Spaltbildung zeigte eine Leukozytenrekrutierung und -aktivierung an, nachweislich vermittelt durch die Fc-Anteile der gebundenen Autoantikörper. Die histologische Untersuchung ergab zudem, dass Granulozyten, nicht jedoch Monozyten, die beobachtete immunpathologische Reaktion hervorrufen (56).

Das ex-vivo-Kryosektionsmodell wie der passive Transfer von Autoantikörpern haben das Verständnis der dem Krankheitsbild der EBA zugrunde liegenden Effektormechanismen deutlich erweitert. Beide Modelle ermöglichen jedoch keine nähere Untersuchung der vorgeschalteten Autoimmunreaktionen. Sitaru et al.

[†] Kriterien, die eine Erkrankung nach Witebsky et al. als autoimmun definieren: 1. Klinische Hinweise und Zufallsbefunde (z. B. die Anwesenheit von Autoantikörperablagerungen im Gewebe); 2. Reproduktion der Erkrankung in Versuchstieren durch passiven Transfer autoreaktiver Antikörper und/oder T-Zellen; 3. Induktion der Erkrankung durch Immunisierung von Versuchstieren mit dem Autoantigen; verändert nach (75)

gelang es 2006 erstmalig, durch Immunisierung von SJL/J-Mäusen mit einem rekombinant gewonnenen Fragment der murinen NC1-Domäne des Kollagen VII (mCOL7C, Aminosäuren 757-967) eine Autoantikörperbildung zu bewirken, die in einem EBA-typischen, subepidermal blasenbildenden Phänotyp resultierte (53). Mit diesem so genannten aktiven Mausmodell der EBA eröffnete sich die Möglichkeit, wichtige und noch nicht beschriebene Prozesse wie die Initiierung der Autoantikörperbildung in einem in-vivo-Ansatz näher untersuchen zu können. Drei mit diesem Modell gewonnene Ergebnisse verdienen für diese Dissertationsschrift besondere Beachtung:

1. Nach mehrmaliger Immunisierung resistente bis geringgradig empfängliche Mäuse der Stämme SKH-1 und BALB/c zeigten an der dermoepidermalen Junction (DEJ) vor allem Antikörper der Subklasse IgG1 ohne komplementfixierende Eigenschaften, während allein empfängliche SJL/J-Mäuse hier regelhaft Bindung komplementaktivierender Antikörper der Subklassen IgG2a und IgG2b aufwiesen (53). Dieses Verteilungsmuster findet sich in vergleichbarer Form in Patienten mit EBA (54, 77).
2. Dermoepidermale Bindung komplementfixierender Autoantikörper der Klasse IgG2 und Ausbildung eines klinischen Phänotyps in SJL/J-Tieren scheinen mit dem MHC-Haplotyp H2s korreliert zu sein, während Mäuse anderer Stämme mit einem von H2s abweichenden Haplotyp des MHC keine oder nur geringe Bindung komplementfixierender Antikörper zeigten (78).
3. Als Effektorzellen kommen T-Lymphozyten zwar nicht in Frage (dies sind, wie bereits ausgeführt, Granulozyten), für die Ausbildung autoreaktiver Antikörper sind sie jedoch unerlässlich: Athymische SJL/J^{nu/nu}-Mäuse besitzen keine T-Zellen und zeigten, im Gegensatz zu SJL/J^{wt/wt}-Wildtyptieren, nach Immunisierung mit mCOL7C keine dermoepidermalen IgG- und C3-Ablagerungen oder Krankheitszeichen. Durch adoptiven Transfer von T-Lymphozyten immunisierter SJL/J^{wt/wt}- in SJL/J^{nu/nu}-Mäuse und anschließende in-vivo-Restimulation dieser Tiere mit mCOL7C konnte mit dermoepidermalen IgG- und C3-Ablagerungen und dem Erkranken der

athymischen Mäuse der Beweis erbracht werden, dass autoreaktive T-Zellen in der Ätiopathogenese der murinen EBA involviert sind (79).

Diese Befunde lassen zum einen eine Beteiligung von CD4⁺ T-Helferzellen der Typen 1 und 2 (Th1- und Th2-Lymphozyten) vermuten, da bekannt ist, dass der plasmazytäre Klassenwechsel zu den murinen Antikörpersubklassen IgG2 und IgG1 durch die Zytokine Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-4 (IL-4) reguliert wird (80-82). So könnte die Entwicklung des EBA-Phänotyps, unter vorwiegender Beteiligung komplementfixierender (pathogener) IgG2-Autoantikörper, durch IFN- γ -sezernierende Th1-Lymphozyten vermittelt werden, während Th2-Lymphozyten mit IL-4-Sekretion und nachfolgendem Klassenwechsel zu nicht komplementfixierenden (nicht pathogenen) Autoantikörpern der Klasse IgG1 eine Erkrankung verhindern (83-85).

Zum anderen könnte die Ausbildung einer Th1- oder Th2-typischen Antwort wiederum von dem murinen MHC-Haplotyp abhängen: Dieser definiert sich über die Kombination der verschiedenen Allele der im Major Histocompatibility Complex-Lokus gelegenen Gene[‡] (86, 87). So ist denkbar, dass die hier kodierte, APC-vermittelte Präsentation des prozessierten mCOL7C in Mäusen unterschiedlicher Haplotypen differiert und sich dies, wie in Autoimmunitätsmodellen zum humanen Kollagen IV gezeigt, in dichotomer Weise auf Zytokinmilieu und Immunantwort auswirkt (88-91).

Diese hypothetischen Überlegungen führten zu folgenden Fragestellungen, die mit der vorliegenden Dissertationsschrift erstmalig erarbeitet wurden:

1. Kann die Ausbildung eines klinischen Phänotyps im aktiven Mausmodell auf ein Überwiegen komplementfixierender Autoantikörper der Klasse IgG2 (und ihrer Subklassen) gegen das murine Kollagen VII *in Serum und Haut* zurückgeführt werden, und zeigen resistente Tiere hier vor allem nicht komplementfixierende Antikörper der Klasse IgG1?

Zu diesem Zwecke wurde eine detaillierte Untersuchung der Kinetiken zirkulierender wie antigengebundener Autoantikörper mittels ELISA und DIF vorgenommen.

[‡] In der Maus wird der auf Chromosom 17 gelegene Major Histocompatibility Complex-Lokus H2 genannt und enthält immunregulatorische Klasse I- (K, D, L, QA, Tla), Klasse II- (A β , A ϵ , E β , E α) und Klasse III-Gene (C4A, Bf, C2, LT β , TNF, LT α). Im Haplotyp H2s von SJL/J-Tieren findet sich die allelische Variante s der einzelnen MHC-Gene, während der Haplotyp H2b (C57Bl/6) hier die Variante b aufweist.

2. Ist die Ausbildung komplementfixierender Autoantikörper nach subkutaner Immunisierung mit mCOL7C korreliert mit einem Th1-Milieu des drainierenden Lymphknotens, und können nicht komplementfixierende Autoantikörper hier mit einer Th2-Polarisierung in Beziehung gesetzt werden?

Es erfolgte mittels quantitativer real-time PCR eine Analyse der Genexpression der Schlüsselzytokine einer Th1- und Th2-Antwort (IFN- γ und IL-4) am Ort des Toleranzverlusts.

3. Korreliert der murine MHC-Haplotyp H2s mit einem Th1-Milieu im drainierenden Lymphknoten, und führt ein anderer Haplotyp zu einer davon abweichenden, Th2-dominierten Immunantwort?

Unter Einsatz kongener Mäuse wurde der Einfluss des Haplotyps H2s auf das Zytokinmilieu und die Synthese komplementfixierender Antikörper untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Wildtypmäuse der Inzuchtstämme SJL/J (H2s), BALB/c (H2d) und C57Bl/6 (H2b) wurden direkt von Charles River (Sulzfeld) bezogen, kongene C57Bl/6.s-Tiere (C57Bl/6-Tiere mit dem H2s des SJL/J-Stammes; syn. B6.SJL-H2s) von der Klinik für Dermatologie und Venerologie, Universität zu Lübeck, zur Verfügung gestellt. Wasser und Standardfutter konnten die Mäuse *ad libitum* beziehen, der Hell-Dunkel-Zyklus betrug jeweils 12 Stunden. Die Tierhaltung erfolgte während der Experimentierphase unter pathogenfreien Bedingungen in der gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck (vgl. die dort ausgehängten Untersuchungsprotokolle, Dr. Noël). Vor der Immunisierung konnten sich alle Tiere mindestens fünf Tage akklimatisieren. Zum Zeitpunkt der Immunisierung waren die Tiere 8-10 Wochen alt. Für alle Versuche lagen Genehmigungen der zuständigen Landesbehörde und des Tierschutzbeauftragten der Universität zu Lübeck vor. Durch seinen Betreuer und in Fortbildungen wurden dem Promovenden alle relevanten Techniken im Umgang mit Versuchstieren vermittelt (s. Anhang).

2.2 Immunisierung

Rekombinant gewonnene, GST-gekoppelte Epitope der immunodominanten NC1-Domäne des murinen Kollagen VII (mCOL7C, Aminosäuren 757-967, Molekulargewicht 49,5 kDa) wurden von der Klinik für Dermatologie und Venerologie, Universität zu Lübeck, in einem prokaryotischen Expressionssystem hergestellt und nach Aufreinigung mittels Glutathion-Affinitätschromatographie in PBS gelöst zur Verfügung gestellt (92). Vor Gebrauch erfolgte mittels Criterion TRIS-HCl-Gel (Bio-Rad Laboratories, München) eine Überprüfung der bei -80°C gelagerten Charge auf molekulare Integrität und eine Nachbestimmung der angegebenen Konzentration mittels BCA-Proteinassay (ThermoScientific, Bonn). Unter ständiger Kühlung auf Eis wurde dann in einer Sterilwerkbank (Microflow, Nunc, Wiesbaden) die mCOL7C-GST-Stocklösung unter Zugabe von steriler PBS-Lösung (Sigma-Aldrich, München) und dem Adjuvans TiterMax[®] (Hiss, Freiburg i. Br.) zu einer Emulsion mit der Zielkonzentration $c_{\text{mCOL7C}}=1,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ verarbeitet, wobei die Hälfte des Gesamtvolumens des Ansatzes stets das Adjuvans stellte. Durch intraperitoneale Gabe von 150-200 μl eines Gemisches aus Ketamin und

Xylazin (Sigma-Aldrich) erhielten die Tiere eine Kurznarkose (von ca. 15 Minuten Dauer) und bekamen mit einer Insulinspritze (Omnifix® 1 ml, B. Braun, Melsungen) samt Insulinkanüle (Sterican® Gr. 18, B. Braun) jeweils 25 µl (entspr. 30 µg mCOL7C-GST) der Emulsion subkutan in beide Hinterpfoten gespritzt. Den Kontrolltieren wurde in jede Hinterpfote 25 µl sterile PBS-Lösung (Sigma-Aldrich) gespritzt.

2.3 Evaluation der Erkrankung

Zur Untersuchung der Kinetik der EBA wurden alle Versuchstiere wöchentlich und unmittelbar vor Organentnahme auf Anzeichen der EBA hin untersucht. Dabei schätzte man den Befall der nachfolgend aufgeführten Körperpartien mit den Zeichen der EBA (Erythem, Blasen, Erosionen, Krusten, Alopezie) ab, versah diese Werte nach dem Anteil an der Gesamtoberfläche mit Bewertungsfaktoren und berechnete für jedes Tier und jeden Zeitpunkt einen kumulativen Prozentsatz (Tab. 2).

Körperpartie	Bewertungsmaßgabe (maximaler Prozentanteil)	Bewertungsfaktor
Ohr rechts (re.)	Außenseite (max. 50 %) + Innenseite (max. 50 %)	x 0,025
Ohr links (li.)	Außenseite (max. 50 %) + Innenseite (max. 50%)	x 0,025
Auge re.	Alopezie auf dem das Auge umgebenden Lid (max. 100 %)	x 0,005
Auge li.	Alopezie auf dem das Auge umgebenden Lid (max. 100 %)	x 0,005
Schnauze	Re. Seite (max. 50 %) + li. Seite (max. 50 %)	x 0,025
Kopf	Schläfen, Stirn, Nacken (max. 100%)	x 0,09
Mucosa	Maul bukkal re. (max. 50 %) + bukkal li. (max. 50 %)	x 0,025
Vorderbein re.	Oberschenkel (max. 50 %) + Unterschenkel (max. 30 %) + Pfote (max. 20%)	x 0,05
Vorderbein li.	Oberschenkel (max. 50 %) + Unterschenkel (max. 30 %) + Pfote (max. 20%)	x 0,05
Hinterbein re.	Oberschenkel (max. 50 %) + Unterschenkel (max. 30 %) + Pfote (max. 20%)	x 0,1
Hinterbein li.	Oberschenkel (max. 50 %) + Unterschenkel (max. 30 %) + Pfote (max. 20%)	x 0,1
Schwanz	Max. 100 %, wobei das proximale Drittel 50 % zählt	x 0,1
Torso	Bauch, Flanke re., Rücken, Flanke li. (jeweils max. 25 %)	x 0,4

Tabelle 2 – Angaben zum Verfahren der Evaluation der Erkrankung. Ein Tier mit einem totalen Befall des rechten äußeren Ohres (50 %) und der Hälfte der Fläche des linken inneren Ohres (25 %) sowie einer großflächigen Hautablösung an der rechten hinteren Pfote (20 %) hat nach dieser Bewertung einen kumulativen Scorewert von $50 \times 0,025 + 25 \times 0,025 + 20 \times 0,1 = 3,875$ % (Anteil am gesamten Integument).

2.4 Organentnahme und Serumzentrifugation

Zu den in den Abbildungen des Ergebnisteils ersichtlichen Zeitpunkten wurden die Tiere mit Kohlenstoffdioxid getötet, auf dem Rücken liegend auf einer Korkplatte mit Nadeln an allen Extremitäten fixiert und mit spitzer Präparationsschere von der Symphyse bis zur Fossa jugularis eröffnet, ohne dabei die Bauchfaszie zu beschädigen. Nach rascher Präparation des Fells von Bauch und Brust und Fixierung desselben durch weitere Nadeln erfolgte mit der gleichen Schere ein paramedianer Schnitt durch den Brustkorb, um mit einem weiteren Schnitt das Herz zu zerteilen. Mit einer Insulinspritze (B. Braun) wurde das so ausströmende Vollblut (1-1,5 ml) noch innerhalb des Brustsitus aufgenommen, in ein 1,5 ml-fassendes Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt und bis zum Abzentrifugieren auf Eis gelagert. Hiernach erfolgte die zügige Freipräparation (vgl. Abb. 4), Entnahme, Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff und Lagerung in

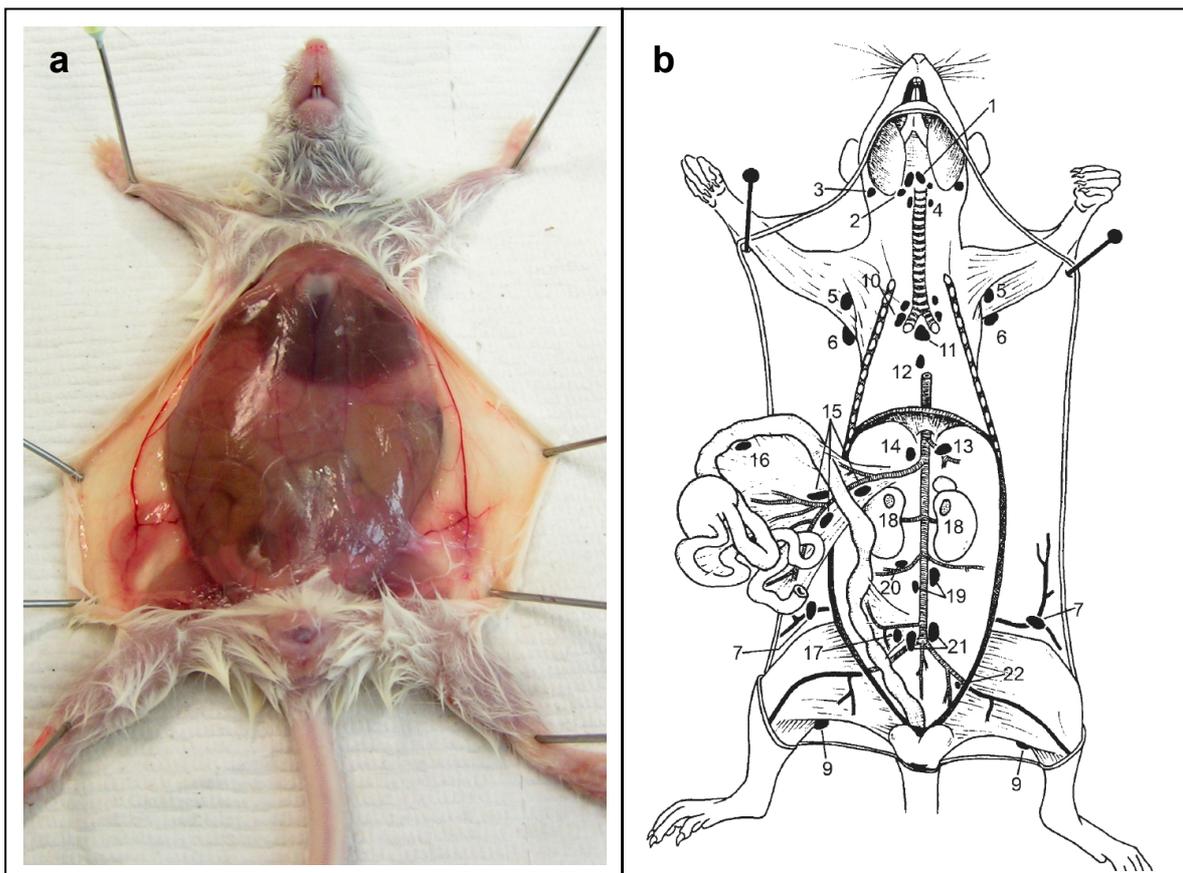


Abbildung 4 – Operationsaspekt einer SJL/J-Maus vor Organentnahme (a) sowie Anatomie der murinen Lymphknoten (b). Zur besseren Schnittführung wurde das Fell vor dem Brust-Bauch-Schnitt mit 70 %-Ethanol angefeuchtet (a). Die Lymphknoten der Maus werden in (b) schematisch dargestellt. Die in dieser Schrift entnommenen Lymphknoten waren inguinalen (7), poplitealen (9), mesenterialen bzw. jejunalen und kolischen (15, 16) Ursprungs. Abb. 4 b wurde entnommen aus (93).

Kryoröhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark) folgender Organe: Popliteale Lymphknoten beidseits, inguinale Lymphknoten beidseits, drei bis fünf mesenteriale Lymphknoten, Milz, Pfotenhaut des Hinterbeins beidseits, Femurknochen beidseits, beide Ohren. Alle organgefüllten Kryoröhrchen wurden bis zur endgültigen Lagerung bei -80°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Vollblut wurde nach erfolgter Operation zentrifugiert (Zentrifuge 5417R, Eppendorf; 15 Minuten, 4500 rpm, 4°C) und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Bei einigen Proben wurde der abzentrifugierte Blutkuchen nicht verworfen, sondern in Lysispuffer (Lysis Solution RL, Analytic Jena, Jena) gelöst und bei -20°C gelagert.

2.5 Anfärbungen von Gefrierschnitten der Haut und des Lymphknotens

2.5.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Mit einem Serienschneidmikrotom Hyrax C50 (Zeiss, Jena) wurden Kryoschnitte von $12\ \mu\text{m}$ Dicke erzeugt und auf Glasobjektträger (Menzel, Braunschweig) verbracht. Nach Lufttrocknung erfolgte die direkte Weiterverarbeitung der Präparate oder eine Lagerung bei -20°C .

2.5.2 Verwendete Lösungen

Methanol/Aceton 1:1	Methanol (Carl Roth, Karlsruhe); Aceton (BDH Prolabo, VWR, Darmstadt)
PBS-Stocklösung	90 g NaCl (Carl Roth); 2,704 g NaH_2PO_4 ; 28,794 g Na_2HPO_4 (beide Merck, Darmstadt); ad 2 l Aqua dest.; pH=7,4
PBS-Gebrauchslösung	200 ml PBS-Stocklösung, 800 ml Aqua dest.
TBS-Stocklösung	242,28 g TRIS (Serva, Heidelberg); 344,40 g NaCl (Merck); ad 4 l Aqua dest.; pH=7,6
Tween 20-Stocklösung	50 ml Tween 20 (Serva); ad 1 l Aqua dest.
TBS-Tween-Gebrauchslösung	100 ml TBS-Stocklösung; 10 ml Tween 20-Stocklösung; ad 1 l Aqua dest.; Zum Spülen zwischen den Färbeschritten und Verdünnen der meisten Antikörper zu nutzen.
Formaldehydfixierlösung	Herstellung einer 4 %-Lösung aus 24 ml 37 %-Formaldehydlösung (Merck) und 198 ml PBS-

	Gebrauchslösung. Vor Gebrauch frisch anzusetzen.
Hämalaun-Gebrauchslösung	1:5-Verdünnung von Hämalaunlösung nach Meyer (Merck), frisch mit PBS-Gebrauchslösung (pH 7,4) anzusetzen.
APAAP-Substrat	20 mg Naphthol AS-MX Phosphat (Sigma-Aldrich), 2 ml N,N-Dimethylformamid (Fluka, Steinheim), 100 µl 1 M Levamisol (0,24 g Levamisol (Sigma-Aldrich) ad 1 ml Aqua dest.), 98 ml 0,1 M TRIS-Puffer (12,1 g TRIS (Serva) ad 1 l Aqua dest.; pH 8,2)
FastRed-Substratlösung	2 mg FastRedTR Salt (Sigma-Aldrich) in 3 ml APAAP-Substrat lösen und nach 10 Minuten unfiltriert auf die Präparate geben.
FastBlue-Substratlösung	4 mg FastBlueBB Salt (Sigma-Aldrich) in 4 ml APAAP-Substrat lösen und nach 10 Minuten filtriert auf die Präparate geben.
DAB-Chromogenlösung	1 ml DAB+ Substratpuffer, 1 Tropfen DAB+ Chromogen (Set von Dako, Glostrup, Dänemark)
Spez. Verdünnungslösung	10 ml PBS-Gebrauchslösung; 0,1 g BSA (Sigma-Aldrich); 0,01 g NaN ₃ (Sigma-Aldrich). Zur Verdünnung einiger hier eingesetzter Proteine einzusetzen.

Alle Spülschritte und Antikörperverdünnungen erfolgten, sofern nicht anders ausgewiesen, in TBS-Tween-Gebrauchslösung. Alle nachfolgend angegebenen Antikörperverdünnungen wurden vor Serienfärbungen auf optimale Anfärbung hin austitriert.

2.5.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Fixierung in Methanol/Aceton 1:1 über 10 Min. (nachfolgend 10') bei -20°C, Spülung in PBS-Gebrauchslösung (nachfolgend PBS) über 2x5', dann 1'-10' mit filtrierter Hämalaun-Gebrauchslösung eindecken. Spülen mit PBS (2x5'), Bläuen (10' in PBS inkubieren), kurz mit Aqua dest. spülen, 1-3' mit 1 % Eosin (Fluka) eindecken, kurz mit Aqua dest. spülen, nacheinander kurz spülen in Methanol

aufsteigender Verdünnungen (70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %, 100 %), dann Inkubation in Xylol (Merck) für 3x2' und mit Entellan[®]-Harzlösung (Merck) eindecken.

2.5.4 Fluoreszenzfärbung von Gr-1 (Ly-6G und Ly-6C)[§]

Fixierung in Methanol/Aceton 1:1 (10', -20°C), 10' spülen, dann für 60' mit 1:500-verdünntem Rat anti-mouse Ly-6G and Ly-6C (#550291, BD Biosciences, Heidelberg) bedecken. 10' Spülung, dann 30' mit 1:200-verdünntem Alexa Fluor[®] 555 goat anti-rat IgG (H+L) (#A-21434, invitrogen, Darmstadt) beschichten. Nach weiterem Spülen (10') mit 1:10⁴ in TBS-Gebrauchslösung verdünntem Kernfarbstoff Hoechst 33342 (invitrogen) überschichten (10'). Nach dem Spülen (10') mit Mowiol[®] 4-88 (Polysciences, Eppelheim) eindecken.

2.5.5 Fluoreszenzfärbungen von IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, C3

Fixierung in Methanol/Aceton 1:1 (10', -20°C), spülen (2x5'), dann für 60' mit dem jeweiligen fluorochromkonjugierten Antikörper bedecken (Verdünnung s.u.). Spülen (2x5') und in Mowiol[®] 4-88 (Polysciences) eindecken.

- Alexa Fluor[®] 555 goat anti-mouse IgG1 (#A21127, invitrogen), 1:400
- FITC rat-anti-mouse IgG2a (#553390, BD Biosciences), 1:800
- FITC rat anti-mouse IgG2b (#553395, BD Biosciences), 1:400
- FITC goat anti-mouse IgG2c (#A90-136F, Bethyl, Montgomery, TX, USA), 1:1000
- FITC goat anti-mouse C3 (#55500, cappel, MP Biomedicals, Solon, OH, USA), 1:200

2.5.6 Fluoreszenzdoppelfärbung von CD138 und mCOL7C

Fixierung in Methanol/Aceton 1:1 (10', -20°C), spülen (2x10'), dann Inkubation über 60' in mit spez. Verdünnungslösung 1:200 verdünntem, biotinylierten mCOL7C-His (mCOL7C-His von Dr. rer. physiol. Katja Bieber, Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck; Biotinylierung durch den Promovenden mit dem EZ-Link[®] Sulfo-NHS-Biotin-Kit, ThermoScientific, und PD-10 Desalting Columns, GE Healthcare, Freiburg i. Br., nach Herstellerangaben). Spülen (2x10'), 30' Inkubation in 1:100-verdünntem Streptavidin Alexa Fluor[®] 488 conjugate (#S-11223, invitrogen),

[§] Zur besseren Wiederauffindbarkeit werden die hier verwendeten Antikörper im Folgenden in ihrer originalen Schreibweise (in englischer Sprache) und mit Artikelnummern (#) versehen wiedergegeben.

Spülung (2x10'), dann 60' Inkubation in 1:200-verdünntem Rat anti-mouse CD138 monoclonal antibody (#553712, BD Biosciences). Spülen (2x10'), 30' Inkubation in Alexa Fluor[®] 555 goat anti-rat IgG (H+L) (#A-21434, invitrogen) und erneutes Spülen (6x10'). Abschließendes Eindecken in Mowiol[®] 4-88 (Polysciences).

2.5.7 Immunhistochemische Doppelfärbung von CD138 und mCOL7C

Fixierung in Methanol/Aceton 1:1 (10', -20°C), Spülung (2x5'), dann Inkubation über 60' in 1:500-verdünntem, biotinylierten mCOL7C-His (Bezug: s. o.). Spülen (2x5'), 30' in 1:500-verdünnter ExtrAvidin[®]-Alkaline Phosphatase (Sigma-Aldrich) inkubieren. Nach dem Spülen (2x5') Entwicklung über 25' mit FastBlue-Substratlösung. Nach Spülung (2x5') Inkubation über 60' in 1:50-verdünntem Rat anti-mouse CD138 monoclonal antibody (#553712, BD Biosciences). Spülen (2x5'), dann mit 1:50-verdünnter (hier wurde der zur Verdünnung eingesetzten TBS-Gebrauchslösung 5 % Mausserum (#10410, invitrogen) zugesetzt) Rabbit anti-rat IgG (H+L) Peroxidase (#312-035-003, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) überschichten und 30' inkubieren. Spülen (2x5'), Entwicklung mit DAB-Chromogenlösung über 5', erneutes Spülen (2x5') und mit Aquatex[®] (Merck) eindecken.

2.5.8 Immunhistochemische Anfärbung von Ki-67 und B220

Fixierung zunächst mit Chloroform (Carl Roth) über 10', dann für 10' mit Aceton (BDH Prolabo, VWR). Spülen (2x5'), dann 45' in 4%-Formaldehydlösung bei 4°C inkubieren. Spülen (2x5'), dann über Nacht inkubieren in mit spez. Verdünnungslösung 1:100 verdünntem Monoclonal rat anti-mouse Ki-67 antigen-Antikörper (Clone TEC-3, #M7249, Dako). Nach dem Spülen (2x5') 30' in 1:500-verdünntem, biotinylierten Rabbit anti-rat immunoglobulins (E0468, Dako) inkubieren (TBS-Gebrauchslösung hier mit 5 % Mausserum (#10410, invitrogen) versehen). Nach dem Spülen (2x5') über 30' mit 1:100-verdünnter ExtrAvidin[®]-Alkaline Phosphatase (Sigma-Aldrich) überschichten, spülen (2x5') und entwickeln über 25' mit FastRed-Substratlösung. Nach Spülung (2x5') 60' Inkubation in mit spez. Verdünnungslösung 1:100 verdünntem Rat anti-mouse CD45R/B220-Antikörper (#553084, BD), spülen (2x5') und 30' in 1:500-verdünntem, biotinylierten Rabbit anti-rat immunoglobulins (E0468, Dako) inkubieren (TBS-Gebrauchslösung hier mit 5 % Mausserum (#10410, invitrogen) versehen). Nach dem Spülen (2x5')

Überschichtung mit 1:100-verdünnter ExtrAvidin[®]-Alkaline Phosphatase (#E2636, Sigma-Aldrich), Spülung (2x5') und Entwicklung über 15' mit FastBlue-Substratlösung. Nach Spülschritt (2x5') kurz mit Hämalaun-Gebrauchslösung bedecken, spülen (5') und mit Aquatex[®] (Merck) eindecken.

2.5.9 Immunhistochemische Anfärbung von TCR β -Ketten

Fixierung in Methanol/Aceton 1:1 (10', -20°C), Spülung (2x5'), dann Inkubation über 60' in 1:100-verdünntem Biotin hamster anti-mouse TCR β chain monoclonal-Antikörper (#553169, BD). 5' spülen, dann 30' mit 1:100-verdünnter ExtrAvidin[®]-Peroxidase (#E2886, Sigma-Aldrich) überschichten, spülen (5') und über 5' mit DAB-Chromogenlösung entwickeln. Nach dem Spülen (2x5') kurzes Anfärben mit Hämalaun-Gebrauchslösung (30''). Spülen (5') und mit Aquatex[®] (Merck) eindecken.

2.6 Auswertung der histologischen Präparate

Hämatoxylin-Eosin-Färbungen sowie immunhistochemische Anfärbungen von CD138, mCOL7C, Ki-67, B220 und TCR β -Ketten fanden lichtmikroskopische Auswertung (BH-2, Olympus, Tokyo, Japan) in repräsentativen Gefrierschnitten des jeweiligen Organs, gegebenenfalls unter Zuhilfenahme eines Okulars mit Zählgitter (Periplan GF 12,5x/18M, Leitz, Wetzlar) und eines Einhandzählers. Fluoreszenzfärbungen von Gr-1, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, C3, CD138 und biotinyliertem mCOL7C wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss, Jena) mit zugehöriger Software (Zeiss) unter Verwendung der jeweiligen Laserexzitationswellenlängen ($\lambda_{UV}=364$ nm; $\lambda_{Argon}=488$ nm; $\lambda_{HeliumNeon}=543$ nm) begutachtet (nach einmaliger Justierung, unter Beachtung konstanter Bedingungen). Dermoepidermal gebundene Antikörper wurden unter manueller Festlegung der ROI (Region Of Interest) an mindestens vier unterschiedlichen Stellen eines Präparates und unter Ermittlung der korrigierten Werte der MFI (Mean Fluorescence Intensity) quantifiziert (d. h. durch Subtraktion der MFI-Werte der jeweiligen Negativkontrollen ohne Primärantikörper). Bestimmungen der Kolo-kalisation von Fluoreszenzantikörpern erfolgten nach den gleichen Prinzipien (94). Größenbestimmungen wurden mit einem Objektmikrometer (Martock, Somerset, England), Flächenbestimmungen an einem Axiovert 200-Lichtmikroskop (Zeiss), welches an ein PALM MicroBeam-System

(Zeiss) zur Laser-Mikrodissektion angeschlossen ist und über eine X-Cite 120-Fluoreszenzlichtquelle (EXFO, Mississauga, Ontario, Kanada) verfügte, ausgeführt. Photographien einzelner Präparate konnten an einem Axiophot-System mit AxioCam HR (Zeiss) angefertigt werden.

2.7 Myeloperoxidase-Assay

Dieser Assay wurde, mit geringen Modifikationen, wie zuvor beschrieben ausgeführt (95, 96). Eine ca. 25 mm² große Probe läSIONALER Haut des Ohres wurde auf der Feinwaage (BP221S, Sartorius, Göttingen) gewogen und mit einem Dispergiergerät (T10 basic, IKA, Staufen) in Extraktionspuffer (1,21 g TRIS (Serva); 0,89 g NaCl (Carl Roth); ad 100 ml Aqua dest.; pH 7,6) homogenisiert. In wässriger 2 %-HTAB-Lösung (Hexadecyltrimethylammoniumbromid, Merck) wurde das Homogenisat mit wiederholten Frier- und Tauschritten (-80°C zu Raumtemperatur, 3x) weiter bearbeitet, um die Myeloperoxidase (MPO) in Lösung zu bringen. Nach Abzentrifugation der Gewebsrückstände (14000 rpm, 15', 5°C) erfolgte in Phosphatpuffer (21,9 ml 0,2 M KH₂PO₄ (Carl Roth); 3,1 ml 0,2 M K₂HPO₄ (Carl Roth); pH 6,0) eine Probenverdünnung auf unbeschichteten 96-well-ELISA-Platten (Nunc) und der Auftrag einer Standardverdünnungsreihe mit MPO definierter Aktivität (25 U/μl; Enzo, Lörrach). 2 M H₂SO₄ (Carl Roth) stoppte die Entwicklung mit gebrauchsfertigem Tetramethylbenzidin, TMB, (Invitrogen) ab und ermöglichte die Quantifizierung der Farbreaktion in einem ELISA-Platten-Spektrophotometer (μQuant, BioTek, Bad Friedrichshall). Nach Berechnung einer linearen Regressionskurve konnte die MPO-Aktivität der jeweiligen Lösungen berechnet und auf das Trockengewicht bezogen werden.

2.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit wesentlichen Modifikationen bislang beschriebener Techniken wurden die Serumkonzentrationen mCOL7C-spezifischer Autoantikörper der verschiedenen IgG-Subklassen nach Immunisierung mit mCOL7C-GST untersucht (53). Dazu gehörten vor allem die Einführung des mCOL7C-His zur Beschichtung der ELISA-Platten (zur Vermeidung einer Mitbestimmung GST-spezifischer Autoantikörper) sowie die Bestimmung des zuvor nicht beachteten IgG2c in SJL/J- und C57Bl/6-Tieren, die, im Gegensatz zu BALB/c-Mäusen, kein IgG2a bilden, dies bislang jedoch fälschlicherweise angenommen wurde (97).

Benötigte, selbst anzusetzende Lösungen

10-fach PBS-Lösung	81,82 g NaCl (Carl Roth); 1,86 g KCl (Merck); 9,17 g Na ₂ HPO ₄ (Merck); 2,04 g KH ₂ PO ₄ (Merck); ad 1 l Aqua bidest.; pH=6,8. Mit Aqua bidest. zu 1-fach PBS-Lösung zu verdünnen.
10-fach Waschpuffer	61 g TRIS (Serva); 82 g NaCl (Carl Roth); 5 ml Tween 20 (Serva); ad 1 l Aqua bidest.; pH=8,0. Vor Gebrauch mit Aqua bidest zu 1-fach Waschpuffer zu verdünnen.
Blocklösung	6,1 g TRIS (Serva); 8,2 g NaCl (Carl Roth); 10 g Bovines Serumalbumin, BSA (Sigma-Aldrich); 0,5 ml Tween 20 (Serva); ad 1 l Aqua bidest.; pH=8,0. Vor Gebrauch steril zu filtrieren mit Millipore Express® PLUS-Filtern (0,22 µm; Millipore, Billerica, MA, USA).
Probenverdünnungslösung	Wie Blocklösung, jedoch ohne Tween 20.

Am Vortag erfolgte die Inkubation beschichteter 96-Well-ELISA-Platten (Nunc) mit in PBS-Lösung verdünntem mCOL7C-His (Dr. rer. physiol. Katja Bieber) der Massenkonzentration $c_{\text{mCOL7C-His}}=5 \mu\text{g/ml}$. Auf die gleichen Platten wurde zudem der jeweilige Fangantikörper für die Standardreihe der untersuchten IgG-Subklasse (in 1:100-Verdünnung in PBS-Lösung) verbracht (#A90-105A, #A90-107A, #A90-109A, #A90-136A, Bethyl). Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Platten ausgegossen, ausgeklopft und mit einer Acht-Kanal-Multipette (Eppendorf) gewaschen (200 µl Waschpuffer/Well, 3x). Nachfolgend fand eine Blockierung mit Blocklösung (200 µl/Well) und 60' Inkubation auf dem Rütteltisch bei 800 rpm (Titramax 1000, Heidolph, Schwabach) statt. Währenddessen wurden auf unbeschichteten 96-Well-ELISA-Platten (Nunc) die Verdünnungen der Probenseren (1:10³, 1:5x10³, 1:2x10⁴; 1:6x10⁴; 1:18x10⁴; 1:54x10⁴; 1:162x10⁴) mit Probenverdünnungslösung mindestens als Duplikat auf Eis angesetzt. Die Referenzseren für die Standardkurve (#RS10-101, #RS10-112, Bethyl) wurden den Herstellerangaben entsprechend in Probenverdünnungslösung angesetzt. Nach einem Waschschrift (200 µl Waschpuffer/Well, 2x) belud man die blockierten Platten mit den Verdünnungen der Proben- und Referenzseren (100 µl/Well) und

inkubierte erneut für 60' auf dem Rütteltisch (800 rpm). Währenddessen erfolgte die Verdünnung der HRP-konjugierten Detektionsantikörper (#A90-105P, #A90-107P, #A90-109P, #A90-136P, Bethyl) nach Herstellerangaben mit Probenverdünnungslösung. Nach einem weiteren Waschschrift (200 µl Waschpuffer/Well, 3x) wurden die Platten mit den Verdünnungen der HRP-konjugierten Detektionsantikörper beladen (100 µl/Well) und für 60' auf dem Rütteltisch bei 800 rpm inkubiert. Dann erfolgte, nach einem Waschschrift (200 µl Waschpuffer/Well, 3x), die Entwicklung mit 100 µl gebrauchsfertiger TMB-Lösung (invitrogen) je Well und nach definierter Zeit das Abstoppen der Farbreaktion mit 2 M Schwefelsäure (Carl Roth). Die Änderungen der optischen Dichte wurden mit einem ELISA-Platten-Spektrophotometer (BioTek) bei $\lambda=450$ nm ausgelesen, und anhand einer nicht linearen, sigmoiden Standardkurve (Chapman-Regression, drei Parameter, $R^2>0,99$) konnten sodann die Serumkonzentrationen berechnet werden.

2.9 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Unter möglichst RNase-freien Bedingungen (nach Oberflächenbehandlung mit 1 %-SDS-Lösung, Carl Roth) erfolgte mithilfe des innuPREP RNA Mini Kits (analytic jena) die Extraktion von RNA aus 1.) Gefrierschnitten des drainierenden Lymphknotens (12 µm dick, 5 Stück, lysiert in 700 µl des mitgelieferten Lysispuffers) oder 2.) abzentrifugierten Zellen des Blutes (Überführung des soliden Blutkuchens in Lösung durch Zugabe von 700 µl des o. g. Lysispuffers und wiederholtes Homogenisieren mit Insulinspritze (Omnifix® 1ml, B. Braun) und Insulinkanüle (Sterican® Gr. 18, B. Braun), ggf. weitere 1:10-Verdünnung dieses Homogenats in Lysispuffer und weiteres Scheren). Die so gewonnenen 60 µl Filtrat mit RNA wurden, um die Konzentration der RNA zu erhöhen, mit einer Vakuumkonzentrationszentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf) auf 8 µl eingedampft. Nach Kontrolle des Volumens und eventueller Korrektur mit Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser (Sigma-Aldrich) erfolgte unter Zugabe von 1 µl DNase I (1 U/µl; Sigma-Aldrich) und 1 µl 10-fach Reaktionspuffer (200 mM TRIS-HCl; 20 mM MgCl₂; pH=8,3; Sigma-Aldrich) über 15' ein DNA-Verdau bei Raumtemperatur. Abstoppen dieser Reaktion durch Zugabe von 1,5 µl 1 mM EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich) und Glättung der RNA durch 10' Inkubation bei 70°C (AccuBlock Digital Dry Bath, Labnet, Woodbridge, NJ, USA) und sofortiges

Verbringen auf Eis. Dann Zugabe von 8,5 µl einer vorher angesetzten Lösung aus 0,5 µl SuperScript II Reverse Transcriptase (200 U/µl; invitrogen), 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (invitrogen), 4 µl 5-fach First-Strand Buffer (250 mM TRIS-HCl; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; pH=8,3; invitrogen), 1 µl 0,14 mM Random Hexamer-Oligonucleotide (5'-(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)-3'; MWG Biotech, Ebersberg), 1 µl 10 mM dNTP-Mix (peqGOLD, peqLab, Erlangen) und Inkubation über 50' bei 42°C (AccuBlock Digital Dry Bath, Labnet). Nach kurzer Anzentrifugation erfolgten abschließend Reaktionsstopp durch Inkubation über 15' bei 70°C (AccuBlock Digital Dry Bath, Labnet), Ausmessen des Ansatzvolumens (gegebenenfalls mit Aqua dest. auf 20 µl auffüllen) und Lagerung der gewonnenen cDNA bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung.

2.10 Quantitative real-time PCR

Zur relativen Quantifizierung der Genexpression eignet sich das Prinzip der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion. Dieses Verfahren beruht auf der herkömmlichen Polymerase Chain Reaction (PCR) und ermöglicht durch die Messung von Fluoreszenzsignalen eine Quantifizierung der während dieser Reaktion entstehenden, durch die Primerwahl definierten DNA-Fragmente, da die Fluoreszenz aufgrund der Eigenschaften der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe oder FRET-Sonden proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt (vgl. Abb. 5). Da nur während der exponentiellen Reaktionsphase optimale Reaktionsbedingungen vorliegen, konzentriert man sich bei der Auswertung auf diesen Abschnitt der real-time PCR. Der Beginn dieser Exponentialphase wird definitionsgemäß mit dem Ct-Wert (Cycle threshold) beschrieben: Ab diesem Reaktionszyklus (bestehend aus Denaturation, Primeranlagerung und Elongation) findet für einige Zyklen eine optimale Reaktion statt. Die allgemeine Formel eines exponentiellen Wachstums während einer PCR lautet $X_n = X_0 \cdot (1 + E_X)^n$ (X_n : Zahl der Zielmoleküle im Zyklus n; X_0 : Zahl der Zielmoleküle zu Beginn der Reaktion; E_X : Effizienz der Zielmolekülvervielfachung; n: Zykluszahl), am Ct lautet die Formel entsprechend $X_t = X_0 \cdot (1 + E_X)^{Ct(\text{Zielmolekül})}$ (X_t : Zielmoleküle am Ct; $Ct(\text{Zielmolekül})$: Ct des Zielmoleküls). Für eine relative Quantifizierung wird die Reaktion des Zielmoleküls (z. B. das Produkt eines Zielgens) auf die eines (idealerweise nicht regulierten) Moleküls (sogenanntes Housekeeping-Gen, HKG) derselben untersuchten Probe bezogen (Normalisierung). Es gilt entsprechend für

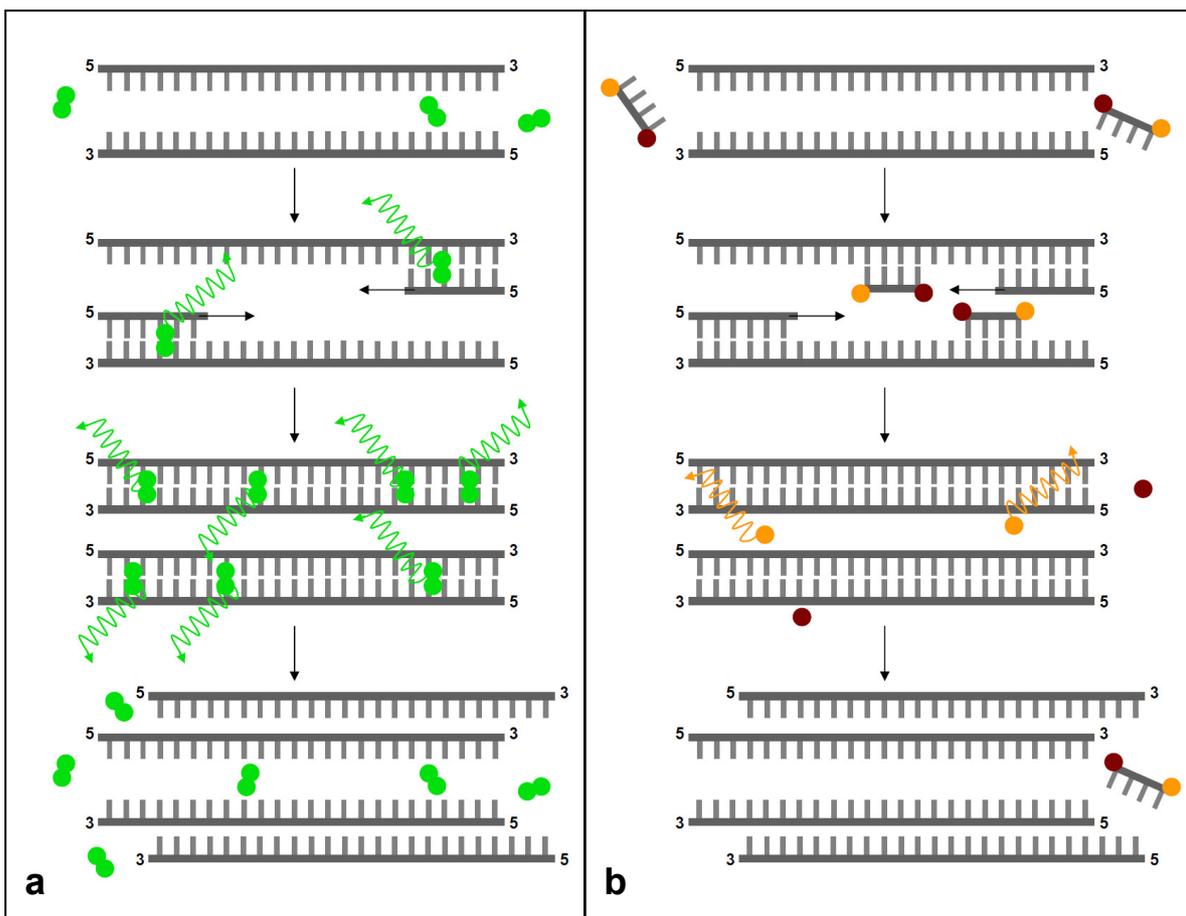


Abbildung 5 – Darstellung zweier Methoden der Erzeugung eines Fluoreszenzsignals in der quantitativen real-time PCR: a) Der interkalierende Farbstoff SYBR®-Green I bindet nur an dsDNA, mit Zunahme der Ziel-DNA nimmt so die messbare Fluoreszenz nach Anregung zu. Wegen der Möglichkeit unspezifischer Bindung ist man auf eine Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte nach Ende der PCR angewiesen (vgl. Abb. 6 a). b) TaqMan-Sonden arbeiten unter Ausnutzung des FRET (Förster-Resonanzenergietransfer): Bei Anregung des Reporters (orange) gibt dieser die Energie an den Quencher (dunkelrot) weiter (kein Signal). Nach Bindung im Zielgen werden Reporter und Quencher durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase räumlich voneinander getrennt, auf Anregung hin gibt der Reporter ein Signal ab. Dieses Verfahren ist sehr spezifisch. In beiden Methoden wird am Ende jedes PCR-Zyklus nach Laserimpuls das Fluoreszenzsignal gemessen. Verändert nach (98)

das Referenzmolekül $R_t = R_0 \cdot (1 + E_R)^{Ct(\text{Referenzmolekül})}$ und für die Ratio Zielmolekül/Referenzmolekül $X_t/R_t = (X_0 \cdot (1 + E_X)^{Ct(\text{Zielmolekül})}) / (R_0 \cdot (1 + E_R)^{Ct(\text{Referenzmolekül})})$. Dies lässt sich nach den Potenzgesetzen und unter der Annahme gleicher Effizienzen der Reaktionen ($E_X = E_R = E$) vereinfachen zu $X_t/R_t = (X_0/R_0) \cdot (1 + E)^{Ct(\text{Zielmolekül}) - Ct(\text{Referenzmolekül})} = X_N \cdot (1 + E)^{\Delta Ct} = K$ (X_N : = Normalisierte Zielmolekülmenge; ΔCt : = Differenz der Ct-Werte von Zielmolekül und Referenzmolekül; K = Konstante**). Umstellung ergibt schließlich für die normalisierte Zielmolekülmenge $X_N = K \cdot (1 + E)^{-\Delta Ct}$. Sinn dieser Untersuchungen

** Die Konstante K ist abhängig von vielen Faktoren, z. B. von dem Fluoreszenzfarbstoff oder dem Abbau der verwendeten Reporter-sonde im TaqMan-Verfahren.

kann es sein, Genexpressionsunterschiede zweier verschiedener Versuchsgruppen zu untersuchen. Dazu rechnet man $X_{N1}/X_{N2} = (K \cdot (1+E)^{\Delta Ct1}) / (K \cdot (1+E)^{\Delta Ct2})$ und erhält, wieder unter Annahme gleicher Effizienzen E, den Term $X_{N1}/X_{N2} = (1+E)^{-(\Delta Ct1 - \Delta Ct2)} = (1+E)^{-\Delta \Delta Ct}$. Unter optimalen Bedingungen gilt E = 1 und $X_{n1}/X_{n2} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$. Diese Verfahrensweise hat als $2^{-\Delta \Delta Ct}$ -Methode Eingang in die Literatur gefunden und kam auch in dieser Dissertationsschrift zum Einsatz (99). Die Bestimmung der Effizienzen durch Verdünnungsreihen erbrachte in dieser Promotionsschrift Werte zwischen 90 und 99 Prozent und erlaubte daher den Einsatz der $2^{-\Delta \Delta Ct}$ -Methode (Abb. 6 c).

Der Ansatz der für die real-time PCR benötigten Reagenzien erfolgte wie zuvor von unserer Arbeitsgruppe beschrieben (100, 101). Ein Reaktionsansatz enthielt dazu 0,625 µl cDNA, 2 µl Primer-(Sonden-)Mix (Formulierung: s. u.), 10 µl Mastermix mit DNA-Polymerase, Puffern und Desoxyribonukleosidtriphosphaten (qPCR Core Kit für das TaqMan-Verfahren, qPCR MasterMix Plus for SYBR®-Green I für das SYBR®-Green I-Verfahren, beide Eurogentec, Köln) und 7,375 µl Aqua destillatum. Der für das TaqMan-Verfahren benötigte Primer-Sonden-Mix für die Bestimmung von Transskripten der Zytokine IFN-γ und IL-4, sowie solcher des HKG MLN51 enthielt in einem Gesamtvolumen von 2 µl pro Reaktion Vorwärts- und Rückwärtsprimer in einer Stoffmengenkonzentration von jeweils $C_{\text{Primer V/R TaqMan}} = 9 \mu\text{M}$ und Sonden mit $C_{\text{TaqMan-Sonde}} = 2 \mu\text{M}$ (entsprechend einer endgültigen Konzentration im vollständigen Reaktionsansatz von $C_{\text{Primer V/R TaqMan}} = 900 \text{ nM}$ und $C_{\text{TaqMan-Sonde}} = 200 \text{ nM}$). In 2 µl des Primermixes für das SYBR®-Green I-Verfahren lagen die Vorwärts- und Rückwärtsprimer für FcγR_I, FcγR_{IV} und MLN51 in der Konzentration $C_{\text{Primer V/R SYBR}} = 5 \mu\text{M}$ vor, für FcγR_{Ib} galt $c = 10 \mu\text{M}$, für FcγR_{III} $c = 2,5 \mu\text{M}$. Alle Primer und Sonden wurden stets vom gleichen Hersteller synthetisiert und bezogen (MWG Biotech). Die Sequenzplanung der Primer (Tab. 3) fand mit dem Programm CloneManager (SciEd, Cary, NC, USA) statt, zum Ausschluss anderer Bindungsstellen im Genom erfolgte ein NCBI-Blast. Die Analysen fanden auf den Geräten SDS ABI Prism 7000 und SDS ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Darmstadt) nach folgendem PCR-Schema statt: 6 Minuten bei 95°C (Denaturierung), dann 50 Zyklen mit 30 Sekunden bei 95°C (Denaturierung) und 60 Sekunden bei 60°C (Primeranlagerung und Elongation). Bei SYBR®-Green I-Verwendung schloss sich danach eine zusätzliche Schmelzkurvenanalyse an (Abb. 6 a)

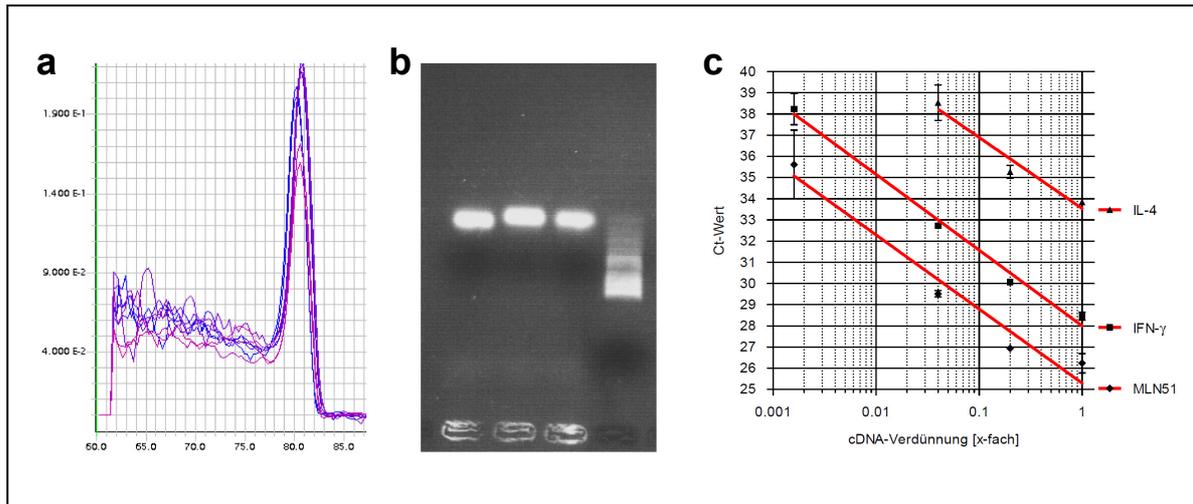


Abbildung 6 – Qualitätskontrollen der quantitativen real-time PCR. (a) Exemplarische Schmelzkurvenanalyse anhand der relativen Quantifizierung des HKG MLN51: Unter Einsatz der SYBR[®]-Green I-Methode muss diese Kontrolle erfolgen, um eine unspezifische PCR auszuschließen. Bei Kontamination der Probe, Mispriming (Bindung der Primer an nicht gewünschte Bereiche der DNA) oder Primer-Dimer-Artefakten (Anlagerung der Primer an sich selbst) würde man vom gemeinsamen Schmelzpunkt abweichende Kurven erkennen können. Die x-Achse zeigt die Temperatur, die y-Achse die zeitliche Änderung des Fluoreszenzsignals. (b) Exemplarische Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Produkten: Eine einzelne Bande zeigt die korrekte Reaktion an, zusätzliche Banden sprächen für unspezifische PCR-Produkte. (c) Effizienzbestimmung der PCR: Die Effizienz lässt sich mit Standardverdünnungen von cDNA und linearer Regression bestimmen: Dazu setzt man die Steigung s dieser Kurve in den Term $E = 10^{-1/s} - 1$ ein und erhält hier für $s_{MLN51} = -3,499$ eine Effizienz $E_{MLN51} = 0,931 = 93,1\%$ (für IFN- γ beträgt $s_{IFN-\gamma} = -3,575$ und $E_{IFN-\gamma} = 0,904$; für IL-4 gilt $s_{IL-4} = -3,355$ und $E_{IL-4} = 0,986$; alle Werte wurden mit der gleichen cDNA-Charge und im gleichen Lauf bestimmt). Der Cut-off-Ct wurde für die in dieser Promotionsschrift durchgeführten Untersuchungen mit 40 Zyklen festgelegt.

Primer	Nukleotidsequenz	Amplicon- größe (bp)	Gene Accession Number NCBI
MLN51 for	5' CCAAGCCAGCCTTCATTCTTG	134	NM_138660.25
MLN51 rev	5' TAACGCTTAGCTCGACCACTCTG		
MLN51 probe	5' CACGGGAACCTTCGAGGTGTGCCTAAC		
IFN- γ for	5' GCAAGGCGAAAAAGGATGC	98	NM_008337.2
IFN- γ rev	5' GACCACTCGGATGAGCTCATTG		
IFN- γ probe	5' TGCCAAGTTTGAGGTCAACAACCCACAG		
IL-4 for	5' GAGACTCTTTCGGGCTTTTCG	96	NM_021283.1
IL-4 rev	5' AGGCTTTCAGGAAGTCTTTCAG		
IL-4 probe	5' CCTGGATTCATCGATAAGCTGCACCATG		
Fc γ R _I for	5' GAAGACACCGCTACACATCTG	147	NM_010186.3
Fc γ R _I rev	5' GTCTCTGCAGGAGCAAATTC		
Fc γ R _{IIb} for	5' GTCGCAGCCATTGTTATTATCC	130	NM_001077189
Fc γ R _{IIb} rev	5' GCTGTCTGTACTIONACTACTTC		
Fc γ R _{III} for	5' GTACACAGCACCAGTCCAAG	117	NM_010188
Fc γ R _{III} rev	5' GCAAACAGGAGGCACATCAC		
Fc γ R _{IV} for	5' GAGGGCTCATTGGACACAAC	119	NM_144559
Fc γ R _{IV} rev	5' GTCCTATCAGCAGGCAGAATG		

Tabelle 3 – Informationen zu den verwendeten Primern (for: Vorwärtsprimer; rev: Rückwärtsprimer) und TaqMan-Sonden (probe). Die mit dem SYBR[®]-Green I-Verfahren ausgeführten relativen Quantifizierungen von Fc γ R_I, Fc γ R_{IIb}, Fc γ R_{III} und Fc γ R_{IV} erfolgten auch im Vergleich zum HKG MLN51, welches jedoch in diesen Ansätzen ohne Sonde angesetzt wurde.

2.11 Statistik

Vergleiche zweier unabhängiger Versuchsgruppen erfolgten mit dem nicht parametrischen Mann-Whitney U-Test (Wilcoxon-Rangsummentest), Vergleiche dreier unabhängiger Gruppen mit dem nicht parametrischen Kruskal-Wallis- und anschließendem Dunn's Post-Hoc-Test. Korrelationen wurden mit Spearman's Rangkorrelationskoeffizienten ρ (rho) ausgedrückt. Als statistisch signifikant galten p-Werte $\leq 0,05$. Signifikanzen mit $p \leq 0,05 > 0,01$ wurden mit (*) kenntlich gemacht, solche $p \leq 0,01 > 0,001$ mit (**) und solche $p \leq 0,001$ mit (***). Alle Berechnungen erfolgten mit den Programmen GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) und SigmaPlot 2001 (Systat Software, San Jose, CA, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Kinetik von Klinik, dermoepidermaler Komplementfixation, kutaner Granulozyteninfiltration und Myeloperoxidase-Aktivität

Das 2006 von Sitaru et al. beschriebene aktive Mausmodell zur Untersuchung der EBA konnte durch den Promovenden am Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck, erfolgreich etabliert werden: Nach Immunisierung von Mäusen des SJL/J- und des BALB/c-Stamms mit dem immunodominanten mCOL7C-Fragment der murinen NC1-Domäne des Kollagen VII zeigten sich nach sieben Wochen deutliche Unterschiede in Klinik, Histologie, dermoepidermaler Komplementfixation und Granulozyteninfiltration (Abb. 7). Die genauere Untersuchung der Klinik im Rahmen der durchgeführten Kinetiken zeigte, dass sich ab Tag 21 post injectionem (p. i.) mit ersten erythematösen und erosiven Veränderungen insbesondere im aurikulären Bereich frühe, EBA-typische Krankheitszeichen einstellen (Abb. 8 a). Mit fortschreitender Beobachtungszeit konnten diese Veränderungen auch in anderen Regionen des Integuments gefunden werden, wie

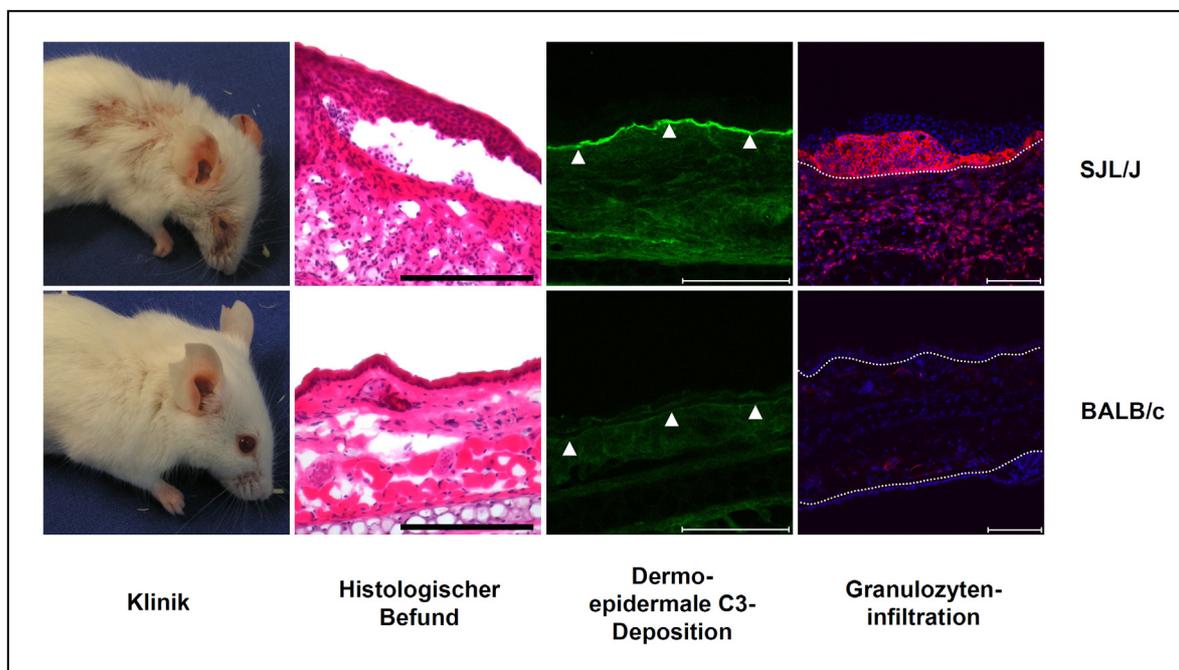


Abbildung 7 – Darstellung von Klinik, Histologie, dermoepidermaler C3-Deposition und Granulozyteninfiltration (in rot, Zellkerne in blau) 49 Tage nach Immunisierung. Es zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen SJL/J- und BALB/c-Tieren. Allein SJL/J-Tiere weisen subepidermale Spaltbildung, starke C3-Deposition an der DEJ (Pfeilköpfe) und massive Granulozyteninfiltration der Haut auf. Die gepunkteten Linien entsprechen der DEJ, die Balken einer Länge von 50 µm.

zum Beispiel im Bereich der Schnauze, der Schläfen, des Nackens und des Rückens, der Beine und des Schwanzes. Auch fiel im Bereich der periokulären Haut eine regelmäßig zu beobachtende und oft vollständige Alopezie auf. Die größten Veränderungen der Klinik fanden sich gegen Ende der Beobachtungszeit (Tage 42 bis 49, vgl. Abb. 8 a). Nicht nur traten dermoepidermale C3-Deposition und Granulozyteninfiltration an Tag 21 p. i. zusammen ein, sie fielen auch mit den ersten klinisch wahrnehmbaren Zeichen zusammen. Die Aktivität der granulozyttypischen Myeloperoxidase (MPO) nahm mit geringer Verzögerung zu. Die berechneten Korrelationen entnehme man der Legende von Abbildung 8.

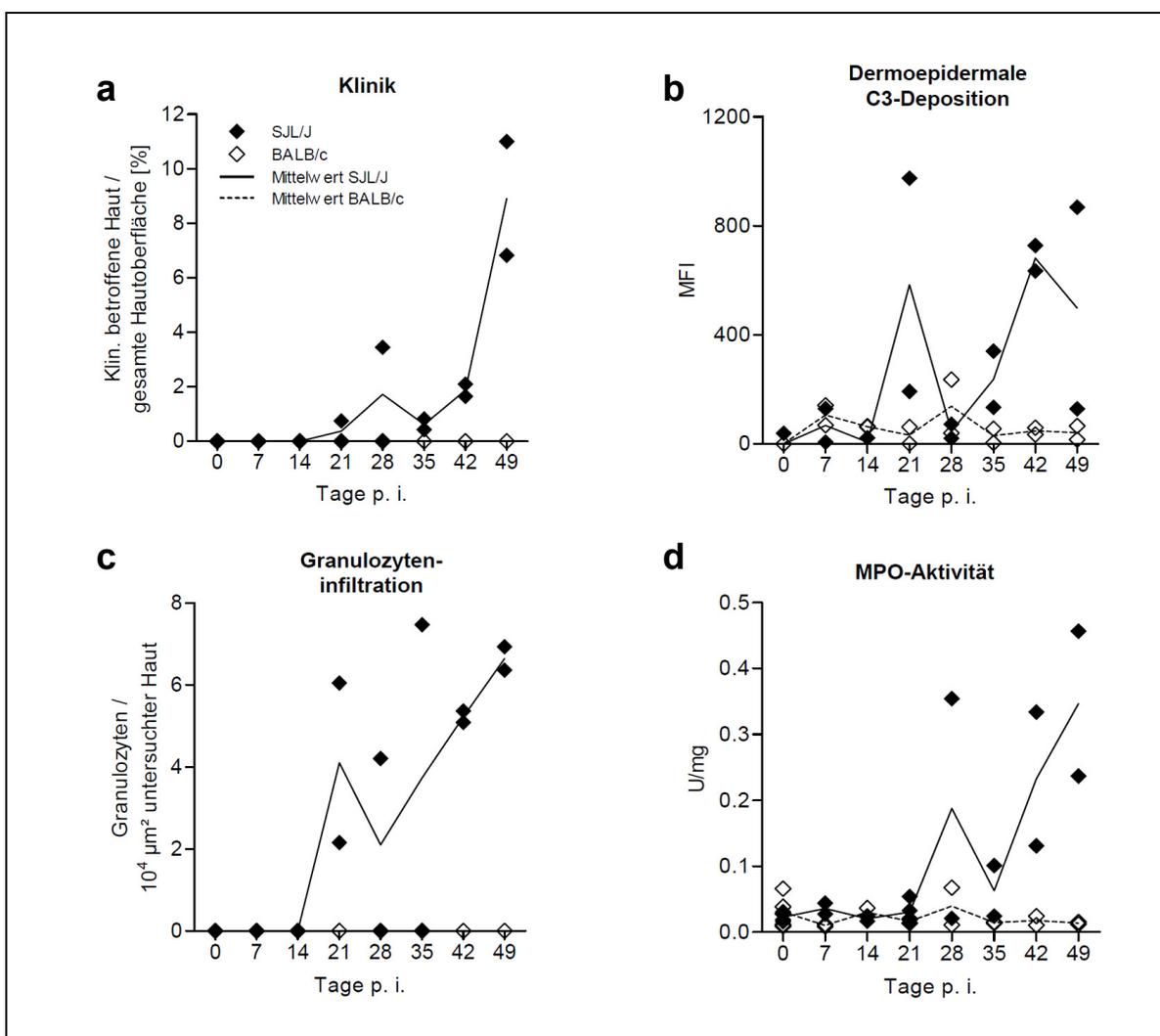


Abbildung 8 – Übersicht über vier Parameter der EBA in SJL/J- und BALB/c-Tieren. Die Klinik (a) korreliert nicht nur mit der Komplementfixierung (b) ($\rho=0,614$; $p=0,011$), sondern auch mit Granulozytenzahl (c) ($\rho=0,838$; $p<0,0001$) und MPO-Aktivität (d) ($\rho=0,817$; $p=0,0001$). Die Auswertungen von b-d erfolgten an Hautbiopsien des Ohres. Zu jedem gezeigten Zeitpunkt wurden zwei Tiere eines jeden Stammes untersucht (SJL/J: schwarz gefüllte Karos; BALB/c: leere Karos; Linien: Mittelwerte). MFI: Mean Fluorescence Intensity; ρ : Spearman's Rangkorrelationskoeffizient p

3.2 Kinetik mCOL7-spezifischer Antikörper in Serum und Haut

Die Quantifizierung von Serumantikörperkonzentrationen und dermoepidermal gebundener Antikörper gegen das murine Kollagen VII erfolgte zu den gleichen Zeitpunkten wie zuvor (vgl. Abb. 8). Im Serum zeigte sich, dass empfängliche SJL/J-Mäuse hohe Konzentrationen von IgG2b-Autoantikörpern aufweisen, die ab Tag 14 p. i. die Serumkonzentrationen der Subklassen IgG2c und IgG1 übersteigen und über drei Wochen auf hohem Niveau verbleiben. Spitzenwerte für IgG2b und IgG1 fanden sich an Tag 21, während IgG2c mit deutlicher Verzögerung Höchstwerte erreichte (Tag 42; Abb. 9 a). EBA-resistente Mäuse des BALB/c-Stammes zeigten ein vergleichbares Verteilungsmuster, jedoch auf einem deutlich niedrigeren Niveau. Folglich erbrachte die berechnete Ratio von komplementfixierenden zu nicht komplementfixierenden Autoantikörpern ($(\text{IgG2b} + \text{IgG2a/c}) / \text{IgG1}$) vergleichbare und nicht signifikant unterschiedliche Werte (Abb. 9 b).

Deutliche Unterschiede zwischen den Stämmen fanden sich hingegen bei Auswertung der Kinetiken dermoepidermal gebundener Autoantikörper: Ab Tag 14 p. i. wiesen empfängliche SJL/J-Tiere eine gut erkennbare Bindung des komplementfixierenden IgG2c-Antikörpers auf, welche die der Subklassen IgG2b und IgG1 überstieg und bis zum Beobachtungsende über fünf Wochen auf einem vergleichbaren Niveau verblieb (Abb. 9 c). Auch konnten an der DEJ signifikante Korrelationen zwischen den C3-Ablagerungen (Abb. 8 b) und den komplementfixierenden Subklassen IgG2c ($\rho = 0,661$; $p = 0,0053$) und IgG2b ($\rho = 0,545$; $p = 0,029$) hergestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigten EBA-resistente BALB/c-Tiere eine frühe dermoepidermale IgG1-Bindung, die in ihrem weiteren Verlauf stets über die verhältnismäßig späte Bindung der Subklassen IgG2b und IgG2a dominierte. Die Berechnung der bereits eingeführten Ratio ($(\text{IgG2b} + \text{IgG2a/c}) / \text{IgG1}$) erbrachte, auf die DEJ angewandt, einen hochsignifikanten Unterschied und veranschaulichte das Übergewicht komplementfixierender Autoantikörper in empfänglichen Tieren (Abb. 9 d).

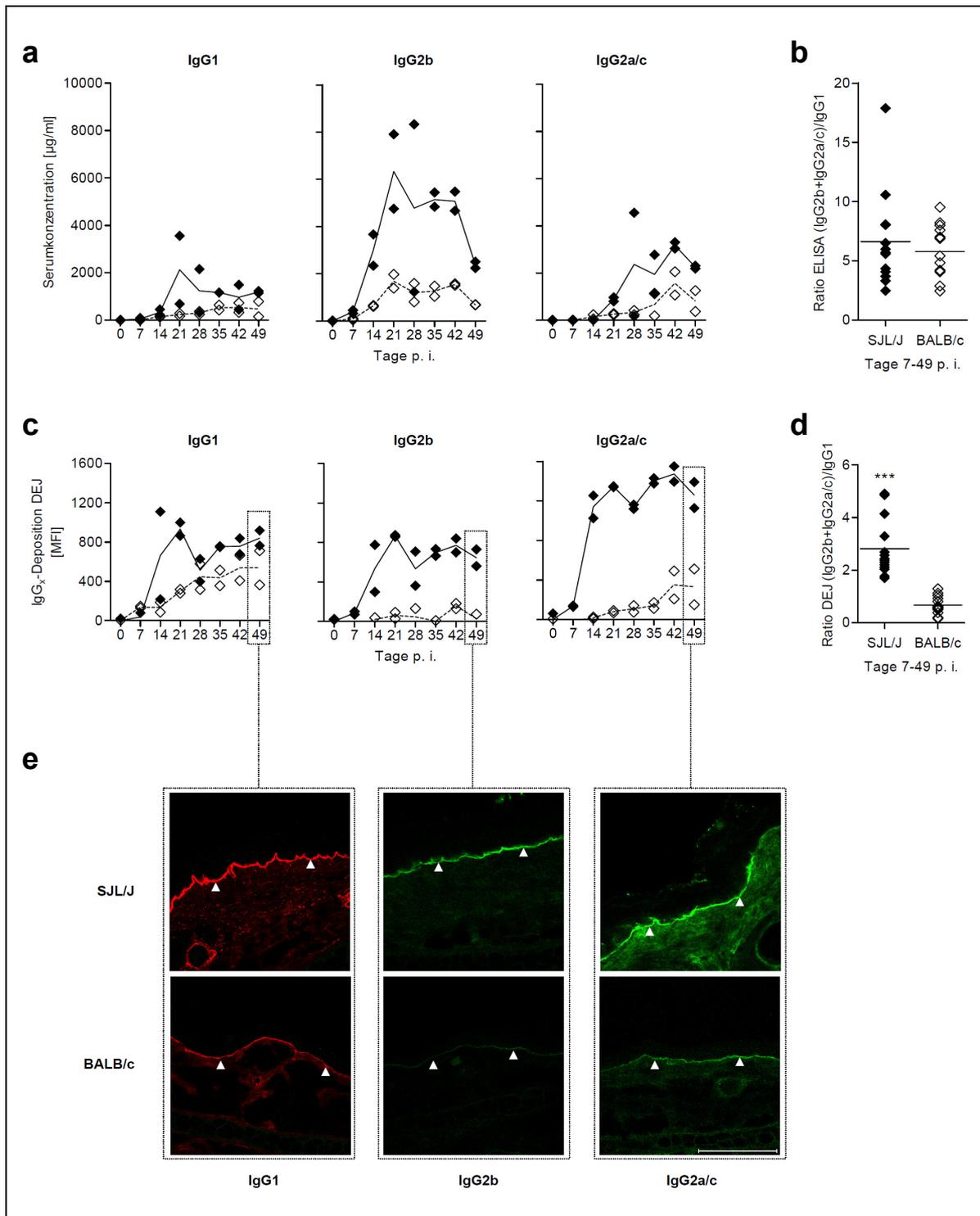


Abbildung 9 – Darstellung der Antikörperkinetiken gegen murines Kollagen VII in der Zirkulation (Serum, a und b) und dem Zielorgan (Ohrhaut, c-e). Die Evaluation erfolgte zu jedem gezeigten Zeitpunkt in jeweils zwei Mäusen eines jeden Stammes (SJL/J: schwarz gefüllte Karos; BALB/c: leere Karos; Linien: Mittelwerte). Im Vergleich von Serum- und DEJ-Kinetiken fiel in SJL-Tieren vor allem die frühe und ausgeprägte IgG2c-Bindung an das Zielantigen auf. Dies könnte ein Indiz für die hohe Avidität dieser Antikörpersubklasse sein (ähnliches könnte für IgG1 in resistenten BALB/c-Tieren gelten). In e werden exemplarisch DIF-Bilder eines Tieres eines jeden Stammes an Tag 49 gezeigt (Pfeilköpfe=DEJ, Balken=100 μm). In (b) und (d) wurde der Mann-Whitney U-Test angewendet, der waagerechte Strich gibt den Mittelwert an.

3.3 Kinetik proliferierender T-Zellen und mCOL7C-spezifischer Plasmazellen des drainierenden Lymphknotens

Der die Haut drainierende Lymphknoten darf in diesem aktiven Mausmodell als Ort des Verlustes immunologischer Toleranz gelten: Nach subkutaner Immunisierung der Versuchstiere im Bereich der Hinterpfoten (vgl. Abschnitt 2.2) konzentrierte sich der Promovend daher für seine Untersuchungen auf den ersten proximal davon gelegenen, poplitealen Lymphknoten (vgl. Abb. 4). Dieser zeigte, im Vergleich zu weiter proximal gelegenen, z. B. inguinalen Lymphknoten, bei makroskopischer Betrachtung regelmäßig die stärkste Reaktion (unstimulierter Durchmesser ca. 1 mm, max. gemessener Durchmesser ca. 8 mm).

Die Evaluation von Ki-67⁺-Zellen im Bereich des Paracortex des Lymphknotens gilt als etablierte Methode zur Abschätzung der T-Zellproliferation (100-102). Diese erbrachte eine hohe Proliferation von T-Zellen in empfänglichen Tieren zwischen Tag 7 und 21 p. i., in resistenten BALB/c-Mäusen fand sich im gleichen Zeitraum eine nur gering erhöhte Zellteilung (Abb. 10 a).

Eine genauere Untersuchung der Kinetik mCOL7C-spezifischer, CD138⁺ Plasmazellen mittels immunhistochemischer Doppelfärbungen (vgl. Abschnitt 2.5.7) zeigte, dass Versuchstiere des SJL/J-Stamms eine kontinuierliche Vermehrung dieser Zellen aufweisen, während in resistenten BALB/c-Tieren die antigenspezifische Plasmazellzahl nach Tag 35 p. i. kontinuierlich zurückgeht (Abb. 10 b). Durch Fluoreszenzdoppelfärbung mCOL7C-spezifischer, CD138⁺ Zellen konnte nicht nur die immunhistochemische Methode bestätigt werden, sondern auch eine Untersuchung von Plasmazelleigenschaften mittels Kollokalisationsstudien vorgenommen werden: Zum Tag 49 p. i. ergaben sich jedoch in SJL/J- und BALB/c-Tieren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der CD138-Präsentation und Antigenbindung über zellmembranständige Immunglobuline (Abb. 10 c).

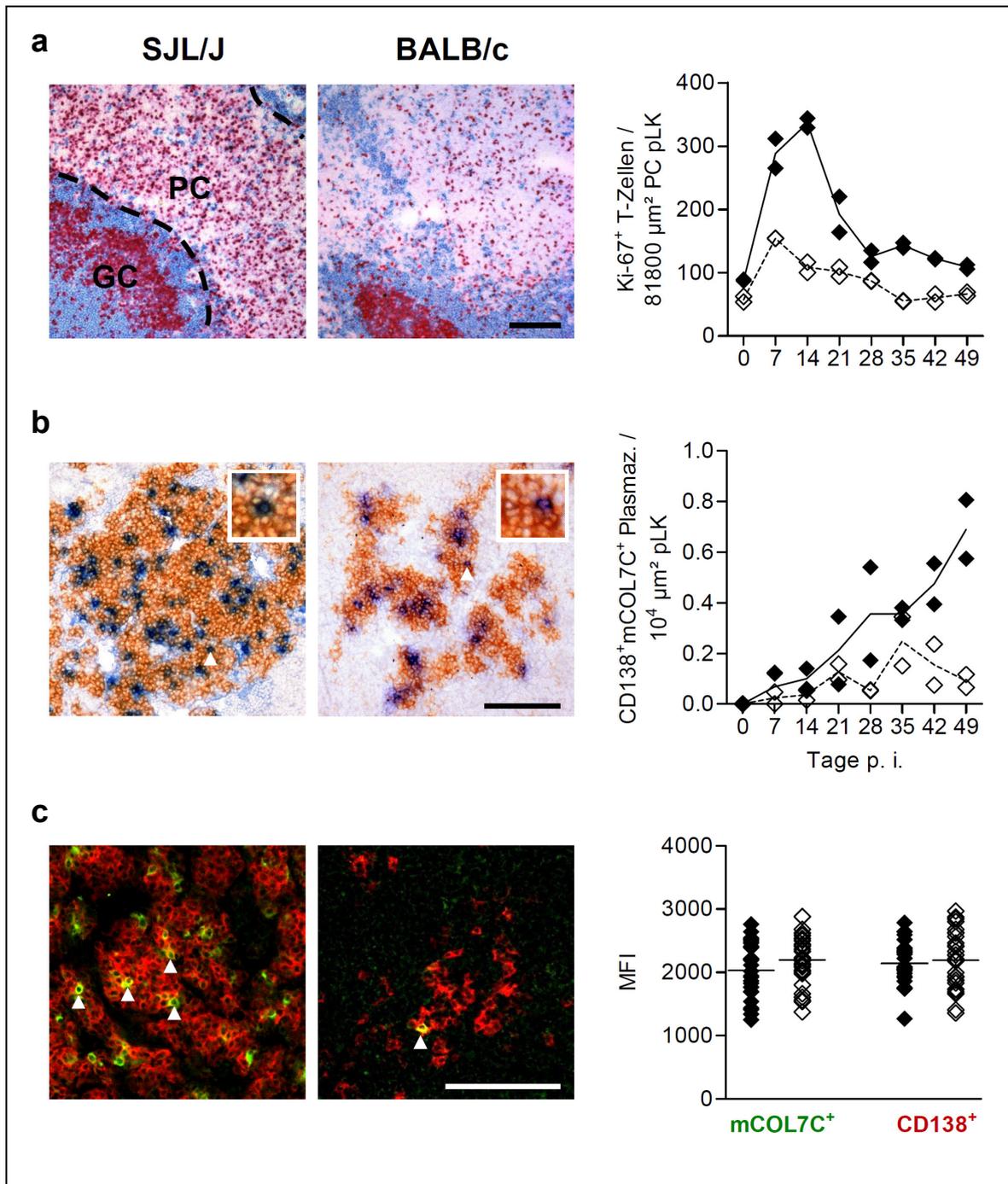


Abbildung 10 – Zelluläre Autoimmunantworten im drainierenden Lymphknoten: In (a) wird die Proliferation von T-Zellen im Paracortex (PC) von SJL/J- und BALB/c-Mäusen gegenübergestellt. Proliferierende Zellen (rot, Ki-67⁺) finden sich auch im Keimzentrum des Cortex (GC), können aber durch die Anfärbung von B-Zellen (blau, B220⁺) von T-Zellen unterschieden werden. Hierzu standen auch T-Zell-spezifische TCR β -Färbungen zur Verfügung (nicht gezeigt). Abschnitt (b) zeigt die erstmals erfolgte Anfärbung antigenspezifischer Plasmazellen im aktiven EBA-Modell. Diese fanden sich nur in den Strängen der Medulla. Die Einsätze zeigen jeweils eine doppelt positive Zelle (CD138⁺ in braun, mCOL7C⁺ in blau). Hier nicht gezeigte Milzschnitte zeigten nur sporadisch mCOL7C-spezifische, CD138⁺ Plasmazellen. Die Doppelfärbung aus (b) konnte mit einer DIF-Färbung (c; CD138⁺ in rot, mCOL7C⁺ in grün, CD138⁺ mCOL7C⁺ in gelb) bestätigt werden und diente zudem zu Kolokalisationsstudien dieser Zellen: Hinsichtlich der mCOL7C-Bindung und CD138-Präsentation unterschieden sich die CD138⁺ mCOL7C⁺ Plasmazellen von SJL/J- und BALB/c-Tieren zum Tag 49 p. i. nicht (n=29-30). SJL/J: schwarz gefüllte Karos; BALB/c: leere Karos; Linien: Mittelwerte; Balken=100 μm

3.4 Untersuchung des Th1-/Th2-Mikromilieus im drainierenden Lymphknoten

Zunächst wurden popliteale Lymphknoten jeweils zweier SJL/J- und BALB/c-Tiere zu den in Abbildung 11 gezeigten Zeitpunkten auf die Genexpression der Schlüsselzytokine einer Th1- (IFN- γ) oder Th2-polarisierten Immunantwort (IL-4) hin untersucht. Für die verlässliche Bestimmung der Genexpression dieser Zytokine erfolgte, auf Basis der Ergebnisse dieser kinetischen Bestimmungen, ein Wiederholungsexperiment mit deutlich größeren Versuchstierzahlen. Der Tag 21 p. i. erschien dabei nicht nur wegen einer guten Diskrimination der Genexpressionen als zu definierender Zeitpunkt der Organentnahme besonders günstig (vgl. Abb. 11), sondern auch wegen des zeitgleichen Auftretens erster Krankheitszeichen (vgl. Abb. 8 a). Das Wiederholungsexperiment (n=8-10 pro Versuchsgruppe und Mausstamm) wurde wie zuvor in den Bestimmungen der Kinetik durchgeführt und erbrachte in SJL/J-Tieren eine signifikante Veränderung der Genexpression von IFN- γ , während IL-4 zu diesem Zeitpunkt, – ganz im Sinne einer starken Th1-Polarisation –, nicht verändert zur Kontrollgruppe exprimiert wurde (Abb. 12 a). Die Expression von IFN- γ in SJL/J-Mäusen war zudem signifikant unterschiedlich

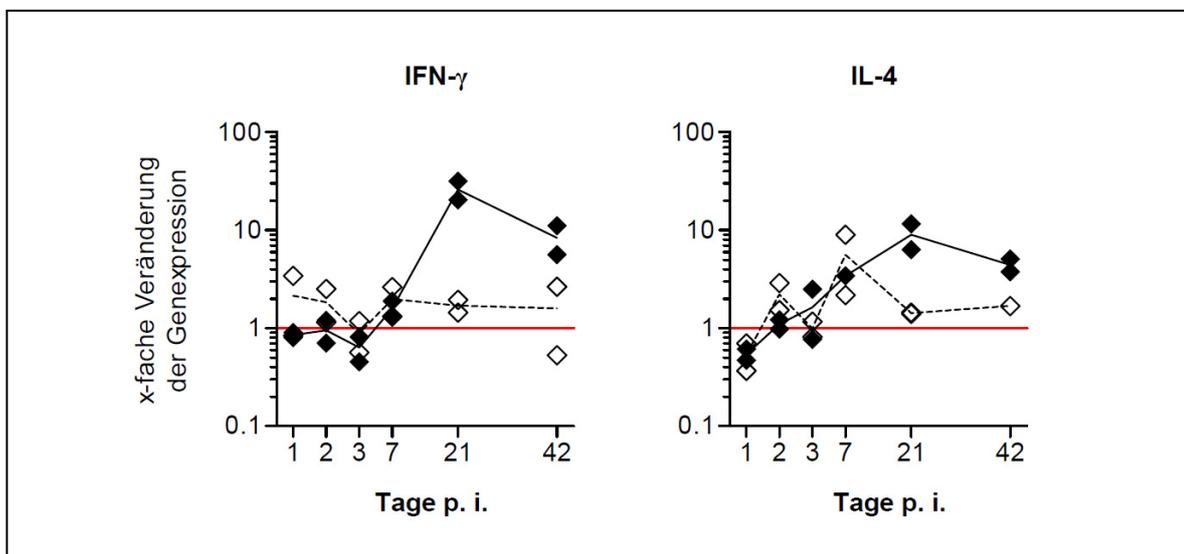


Abbildung 11 – Anzeiger eines Th1- oder Th2-Milieus im zeitlichen Verlauf, untersucht in Gefrierschnitten des drainierenden Lymphknotens von SJL/J- (schwarz ausgefüllte Karos) und BALB/c-Tieren (nicht ausgefüllte Karos). Die Genexpression wurde mittels RT-PCR bestimmt und unter Anwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode als x-fache Veränderung der Kontrollen ausgedrückt (s. Methodenteil, Abschnitt 2.10). Eine den Kontrollen entsprechende Genexpression (keine Veränderung) besitzt den Wert 1 (rote Linien).

zu der in BALB/c-Tieren, die eine gemischte, jedoch Th2-dominierte Reaktion zeigten. Dies wird auch aus der berechneten Ratio der Genexpressionen von IFN- γ und IL-4 ersichtlich (Abb. 12 b). Die SJL/J-Tiere wiesen zum untersuchten Zeitpunkt 21 Tage p. i. einen Befall von $0,47 \pm 0,60$ % des Integuments mit den klinischen Zeichen der EBA auf, während BALB/c-Tiere ausnahmslos keine Klinik entwickelten.

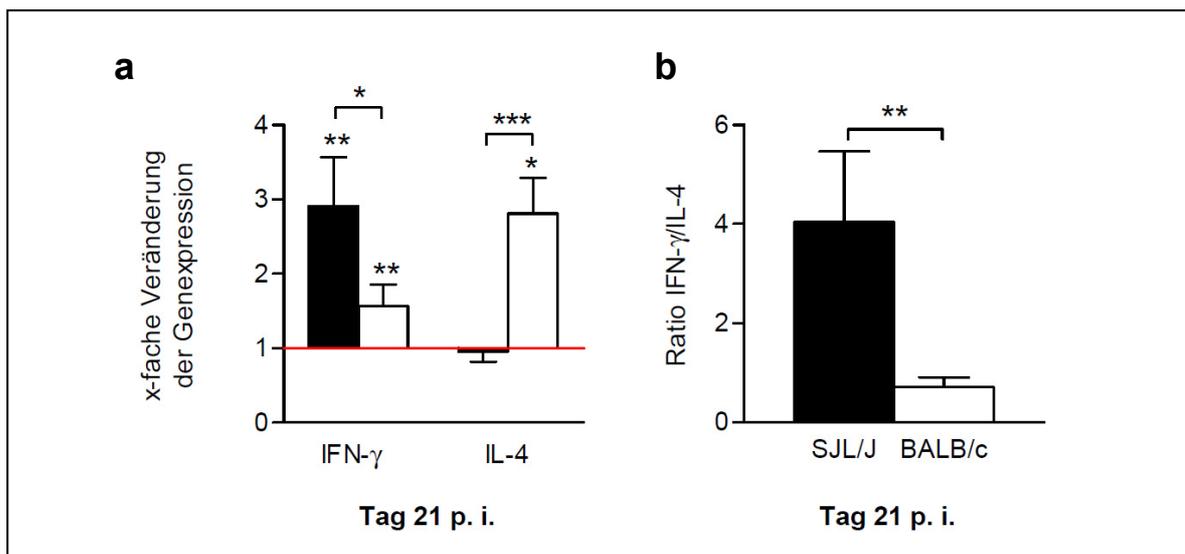


Abbildung 12 – Bestätigung der Kinetikbefunde an Tag 21 p. i. durch ein Wiederholungsexperiment mit n=8-10 (SJL/J: schwarze Balken; BALB/c: weiße Balken). Für die Berechnungen des Signifikanzniveaus wurde der Mann-Whitney U-Test herangezogen, es sind jeweils die Standardfehler gezeigt. Die unteren Signifikanzen in (a) beziehen sich auf den Vergleich mit nicht immunisierten Kontrolltieren des gleichen Stamms (ebenfalls n=8-10). Eine den Kontrollen entsprechende Genexpression (keine Veränderung) besitzt den Wert 1 (rote Linie).

3.5 Untersuchung des Zusammenhanges H2s-Haplotyp – Th1-Polarisation – IgG2-Synthese – Erkrankung

Erkrankung, IgG2-Autoantikörperbildung und Th1-Mikromilieu könnten, wie eingangs hypothetisiert, von der im MHC des Haplotyps H2s kodierten Antigenpräsentation abhängen (SJL/J-Tiere), während andere Haplotypen zu einem davon differenten Th2-Milieu mit IgG1-Bildung und Schutz vor subepidermaler Blasenbildung führen (BALB/c-Tiere mit H2d, C57Bl/6-Tiere mit H2b). Zur Untersuchung dieses möglichen Zusammenhanges immunisierte der Promovend, in Ermangelung kommerziell zu erwerbender kongener BALB/c-Tiere mit dem H2s-MHC von SJL/J-Tieren, kongene C57Bl/6-Tiere mit dem MHC-Lokus von SJL-Mäusen (nachfolgend als C57Bl/6.s bezeichnet) und setzte als Kontrollen Wildtypmäuse des C57Bl/6-Stamms (H2b) ein.

Sowohl SJL- als auch kongene C57Bl/6.s-Mäuse zeigten 21 Tage p. i. eine erkennbare Klinik, die sich jedoch in ihrem Ausprägungsgrad unterschied (SJL/J: $0,47 \pm 0,60$ %; C57Bl/6.s: $0,23 \pm 0,36$ %). Dieser Unterschied ergab sich auch in der Verlaufskontrollgruppe an Tag 49 (SJL/J: $4,45 \pm 1,65$ %; C57Bl/6.s: $1,53 \pm 2,14$ %), was auf eine unterschiedliche Krankheitsprogression trotz gleichen Haplotyps im MHC-Lokus hinwies. Alle Tiere der C57Bl/6-Kontrollgruppe erwiesen sich als klinisch blande (Abb. 13 a). Eine Entwicklung von klinischen Zeichen der EBA in SJL/J- und C57Bl/6.s-Tieren hing außerdem mit einer überwiegenden dermoepidermalen Ablagerung von IgG2 (IgG2c und IgG2b) zusammen, die mit einer entsprechenden C3-Fixation an der DEJ einherging. Klinisch resistente Tiere des C57Bl/6-Stammes zeigten eine überwiegende IgG1-Ablagerung und keine C3-Fixation (Abb. 13 b, c). Auch die Evaluation der Zytokingenexpressionen erbrachte die angenommenen Verhältnisse: Empfängliche SJL/J- und C57Bl/6.s-Mäuse zeigten eine Th1-Polarisation mit ausgeprägter IFN- γ -Expression und T-Zellproliferation, wobei Tiere des letztgenannten Stammes auch eine signifikante IL-4-Expression aufwiesen (im Sinne einer gemischten, jedoch Th1-dominierten Th1/Th2-Immunreaktion). Kontrolltiere des C57Bl/6-Stammes wiesen, im Vergleich zu den nicht immunisierten Kontrollen, keine signifikanten Änderungen der Genexpression von IFN- γ und IL-4 auf, tendenziell ließ sich jedoch eine Th2-Polarisation (Ratio 0,44) mit verstärkter Expression von IL-4, verringerter IFN- γ -Expression und nur geringer T-Zellproliferation ableiten (Abb. 13 d, e, f).

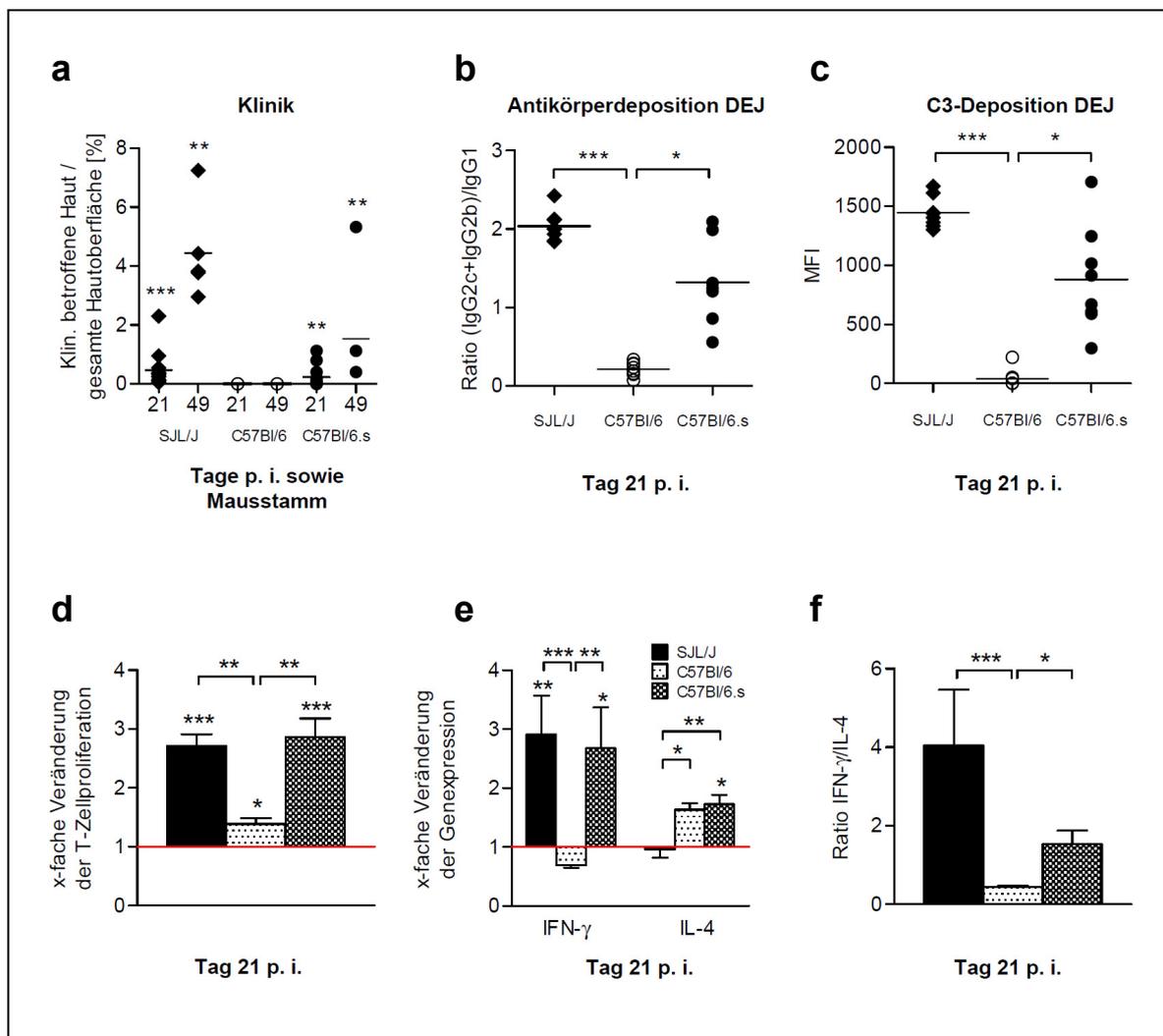


Abbildung 13 – Untersuchung der angenommenen Assoziation von MHC-Haplotyp H2s, Th1-Polarisation, Bildung komplementfixierender IgG2-Autoantikörper und Entwicklung eines EBA-Phänotyps unter Verwendung kongener C57Bl/6.s-Versuchstiere. Die Angaben zum Signifikanzniveau in (a) sowie die unteren Signifikanzangaben in (d) und (e) beziehen sich auf nicht immunisierte Kontrolltiere des gleichen Stamms. In (a) bis (c) sind auch die Mittelwerte gezeigt (waagerechter Strich), in (d) bis (f) der Standardfehler. Angewendete Testverfahren waren der Mann-Whitney U-Test und der Kruskal-Wallis- mit dem Dunn's Post-Hoc-Test. Eine den Kontrollen entsprechende Veränderung von T-Zellproliferation oder Genexpression besitzt den Wert 1 (rote Linien). In allen Gruppen des Tags 21 p. i. befanden sich n=8-10 Mäuse eines jeden Stamms, in solchen des Tags 49 p. i. n=5 Tiere.

3.6 Untersuchung der Expression von Fc γ -Rezeptoren in peripheren Leukozyten

Auf leukozytären Effektorzellen exprimierte Fc γ -Rezeptoren können, nach Bindung des Fc-Teils von IgG-Antikörpern, aktivierende oder inhibierende Signale für Immunantworten vermitteln (82, 103). Unter der Annahme, dass die in Abschnitt 3.5 gezeigten Unterschiede in der Krankheitsprogression bei SJL- und C57Bl/6.s-Tieren auf differierender Expression aktivierender und inhibierender Fc γ Rs durch die Effektorzellen der EBA (neutrophile Granulozyten) basieren könnte, untersuchte der Promovend die Expression von Fc γ R_I, Fc γ R_{III}, Fc γ R_{IV} (aktivierende Rezeptoren) und Fc γ R_{IIb} (inhibierender Rezeptor) in leukozytären Zellen peripher gewonnenen Blutes.

Es zeigte sich, dass allein SJL/J-Tiere eine starke Expression der aktivierenden Rezeptoren Fc γ R_I und Fc γ R_{IV} aufwiesen, während klinisch schwächer empfängliche C57Bl/6.s- und klinisch resistente C57Bl/6-Mäuse alleine eine signifikante Aufregulation der Fc γ R_{IV}-Expression beobachten ließen (Abb. 14).

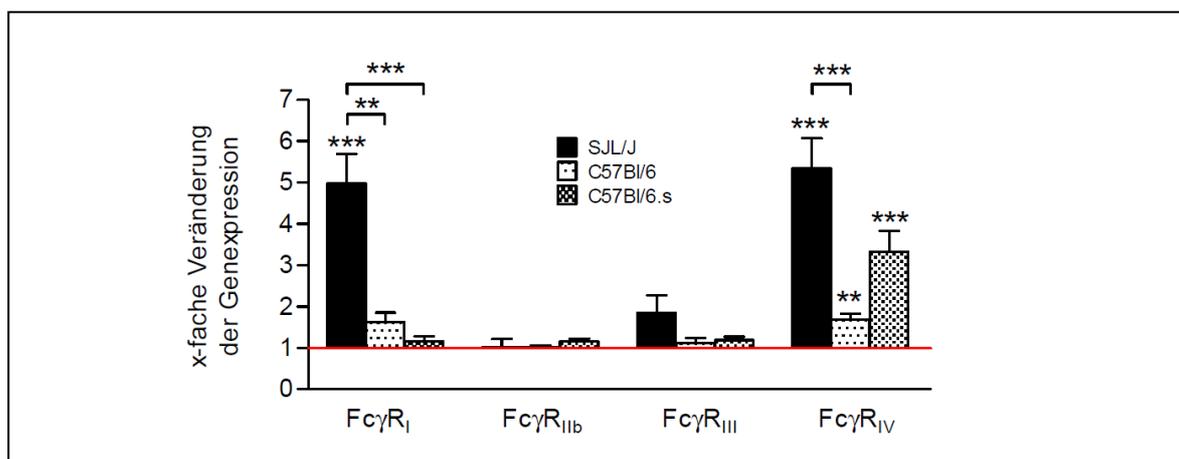


Abbildung 14 – Bestimmung der Genexpression aktivierender wie inhibierender Fc γ -Rezeptoren in peripheren Leukozyten am Tag 21 p.i.. Angewandte Testverfahren waren der Mann-Whitney U-Test (Vergleich der Expression zwischen immunisierten und nicht immunisierten Tieren eines Stamms) und der Kruskal-Wallis-samt Dunn's Post-Hoc-Test (Vergleich der Expression immunisierter Tiere zwischen den Stämmen), gezeigt sind die Standardfehler. Eine den Kontrollen entsprechende Expression (keine Veränderung) besitzt den Wert 1 (rote Linie). Die Fallzahl betrug in jeder Gruppe n=8-10.

4 Diskussion

Die Endstrecke der immunpathologischen Antwort auf das murine Kollagen VII ist mit zahlreichen Arbeiten verhältnismäßig gut charakterisiert und verstanden: Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung des Komplementsystems über den alternativen Weg und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch die NADPH-Oxidase neutrophiler Granulozyten in den Prozess EBA-typischer Gewebsschädigung involviert sind (52, 56, 104). Durch Transfer Kollagen VII-spezifischer IgG-Antikörper von EBA-Patienten sowie von mCOL7C-immunisierten Kaninchen in die Maus konnte die Bedeutung der Autoantikörper im so genannten passiven Modell demonstriert werden (76, 92). Zur Untersuchung früherer Schritte der Autoimmunreaktion bot sich das 2006 von Sitaru et al. etablierte aktive Mausmodell der EBA an, das auf einer Immunisierung der Tiere mit mCOL7C fußt und zu einem EBA-typischen Phänotyp führt (53). T-Zellen erwiesen sich in diesem Modell für die Entwicklung der EBA als unabdinglich, auch gab es erste Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Krankheit, komplementfixierenden Autoantikörpern der Subklasse IgG2 und dem Haplotyp H2s des wichtigen, immunoregulatorischen MHC-Lokus (78, 79). Genaue Daten zu den Kinetiken von Erkrankung, Granulozyteninfiltration, Komplementfixation und dermoepidermal gebundenen wie zirkulierenden Autoantikörpern der verschiedenen Subklassen von IgG findet man in der Literatur jedoch nicht, auch existieren keine publizierten Arbeiten zu zellulären Reaktionen und Zytokingenexpression am Ort des Toleranzverlusts.

Die vorliegende Dissertationsschrift möchte diese Lücke schließen und liefert eindeutige Hinweise dafür, dass die Entwicklung eines Phänotyps im aktiven Mausmodell der EBA auf einer Th1-vermittelten Bildung komplementfixierender IgG2b- und IgG2c-Autoantikörper in Tieren des MHC-Haplotyps H2s beruht. Im Folgenden sollen die wichtigsten Ergebnisse diskutiert werden.

4.1 Die Krankheitsprogression korreliert mit der Kinetik von dermoepidermaler C3-Fixation, Granulozyteninfiltration und MPO-Aktivität

Unter normalen Umständen dient das Komplementsystem als Teil der angeborenen Immunität der Opsonisation von Pathogenen, der Chemoattraktion

von neutrophilen Granulozyten und der Vermittlung von Zellyse (über den Membrane Attack Complex, MAC). Es kann über den klassischen, den Lektin- oder den alternativen Weg aktiviert werden und konvergiert in der Bildung von C3-Konvertasen, die Anaphylaxie (über proteolytische Bildung von C3a-Fragmenten), Oponisation des Pathogens (über C3b) und die Endstrecke bis zum C5b-9-Komplex (syn. MAC) vermitteln (105, 106). Es wurde gezeigt, dass in der Pathogenese der EBA der alternative Weg der Aktivierung involviert ist, obwohl komplementfixierende Antikörper ihre Wirkung üblicherweise über den klassischen Weg der Komplementaktivierung gewinnen (52). Der alternative Weg beruht auf einem Mechanismus der Selbstaktivierung (so genannter „Tickover of C3“^{††}), der einer ständigen Kontrolle durch inhibierende Mechanismen bedarf (z. B. durch den Serumfaktor H) (107). Es wird angenommen, dass diese aktive Kontrolle der spontanen C3-Aktivierung nach Autoantikörperbindung gestört wird, da diese Antikörper als aktivierende Oberflächen wirken könnten. Auch wurde demonstriert, dass in das Gewebe eingewanderte Granulozyten durch Ausschüttung von C3 und Properdin den alternativen Weg selektiv am Ort der Immunpathologie aktivieren können, da sie so das Substratangebot für die Spontanreaktion erhöhen und inhibitorische Mechanismen nicht mehr zu greifen vermögen (107, 108). Neueste Arbeiten bestätigen diese Befunde und zeigen sogar, dass sich neutrophile Granulozyten und Komplement in ihrer Aktivierung gegenseitig bedingen und verstärken (109). Diese Mechanismen können das hier gefundene, zeitgleiche Auftreten von C3 und Granulozyten, die konkordante Zunahme über den gesamten Beobachtungszeitraum und die signifikanten Korrelationen zum Erkrankungsausmaß schlüssig erklären.

Neutrophile Granulozyten vermitteln durch Aktivierung der NADPH-Oxidase und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies die EBA-typischen Gewebsschäden (104). Als Ursache der Hautinfiltration kommen chemotaktische Signale in Frage, die durch Wechselwirkung von Fc-Fragmenten der gebundenen Immunkomplexe mit Fc γ -Rezeptoren (Fc γ Rs) gewebsständiger Zellen (z. B. Mastzellen) gebildet werden und Extravasation und Emigration neutrophiler Granulozyten an den Ort der Immunpathologie fördern (110, 111). Weitere Zunahme kann diese

^{††} Spontane Konformationsänderungen des Komplementfaktors C3 zu C3(H₂O) führen zu Zusammenlagerung mit Faktor B. Nach proteolytischer Abspaltung eines Ba-Fragments durch die Serumprotease Faktor D entsteht so eine C3(H₂O)Bb-Konvertase, die C3 zu C3b (und C3a) spaltet. Dieses C3b kann dann im Sinne einer Verstärkungsreaktion weiteren Faktor B binden und als C3Bb-Konvertase weiteres C3 spalten. Von Granulozyten sezerniertes Properdin kann den Komplex aus Faktor B und C3(H₂O) stabilisieren und fördert die Entstehung von C3Bb-Komplexen.

Hautinfiltration durch elektrostatische Attraktion zusätzlicher, negativ geladener Granulozyten mittels positiv geladener Myeloperoxidase (MPO) erfahren: Dieses Enzym wird nach Aktivierung von Granulozyten ausgeschüttet und wirkt so im Sinne eines positiven Verstärkungsmechanismus (112). Die gleichsinnige und stetige Zunahme von Granulozytenzahl und MPO-Aktivität in dieser Arbeit könnte mit diesen Mechanismen gut erklärt werden.

Die zuvor diskutierten Befunde dürfen auch als Beleg für die erfolgreiche Etablierung des aktiven Mausmodells der EBA am Institut für Anatomie gewertet werden.

4.2 Die beobachtbaren Kinetiken der Autoantikörper unterscheiden sich in Haut und Serum.

Die signifikanten Korrelationen zwischen dermoepidermalen C3-Ablagerungen und IgG2b- und IgG2c-Autoantikörperbindung demonstrieren und bestätigen das komplementfixierende Potential dieser Antikörpersubklassen (85, 103). Während die Relation der verschiedenen Autoantikörpersubklassen zueinander für die Haut das hypothetisierte Übergewicht komplementfixierender IgG2-Antikörper gegenüber nicht komplementfixierenden IgG1-Antikörpern erbrachte, kann dieser Befund im Serum nicht gestellt werden. Mögliche Gründe für diesen Unterschied können die fehlende Berücksichtigung der Antikörperavidität^{‡‡}, Absättigungsphänomene sowie methodische Limitationen umfassen. Auch ist bekannt, dass Kollagen VII-gebundene Autoantikörper eine höhere Halbwertszeit im Vergleich zu zirkulierenden Immunglobulinen besitzen (113). So fällt beim direkten Vergleich der Serum- und Hautverhältnisse auf, dass IgG2c in EBA-empfindlichen Tieren an Tag 14 p. i. früh bindet, während die Konzentrationen im Serum erst wesentlich später ihren Scheitelpunkt erreichen. Dies lässt, insbesondere im Vergleich zu IgG2b oder IgG1 empfindlicher SJL/J-Tiere, auf eine hohe Affinität (und eine besondere biologische Relevanz) des in Voruntersuchungen zur EBA stets nicht berücksichtigten IgG2c schließen und zeigt, dass der Vergleich von ELISA- und DIF-Befunden indirekt eine Abschätzung der Antikörperaviditäten ermöglicht (97, 114). Ähnliches könnte für IgG1 in EBA-resistenten BALB/c-Tieren gelten, welches früh und deutlich messbar an die Haut

^{‡‡} Die Avidität bezeichnet, im Gegensatz zur Affinität, die Gesamtheit der Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen. Antikörperaffinität beschreibt die Kraft einer einzelnen Antigen-Antikörper-Bindung.

bindet (Tag 7 p. i.), während die messbaren Serumkonzentrationen noch niedrig sind. An BALB/c-Mäusen darf außerdem ein Absättigungsphänomen der Haut vermutet werden: Während der Bindung von IgG1 nimmt die IgG2b- und IgG2a-Bindung nur sehr gering und erst gegen Ende der Beobachtungszeit zu, und dies trotz ansteigender Serumkonzentrationen der letztgenannten Subklassen, die jene des IgG1 übersteigen (dieser beschriebene Effekt könnte jedoch auch durch geringere Aviditäten der Subklassen IgG2b und IgG2a erklärt werden oder durch diesen Mechanismus ergänzt werden). Die Beobachtungen scheinen auch eine höhere Halbwertszeit gebundener Antikörper zu bestätigen.

Zuletzt sollen methodische Einschränkungen Erwähnung finden: Das im hier verwendeten ELISA benützte Substrat mCOL7C könnte eine andere Konformation als der entsprechende Proteinteil im nativen, in-vivo nachweisbaren Kollagen VII besitzen und folglich Antikörperbindung und -messung beeinflussen. Hinzu treten Unterschiede in den in-vivo- und in-vitro-Reaktionsbedingungen. Diese Überlegungen betreffen auch in der Literatur beschriebene Verfahren zur Messung der Antikörperaviditäten (115-117). Ferner besteht das vom Hersteller gelieferte Referenzserum aus gepooltem Serum verschiedener Stämme und kann, in Verbindung mit dem dazugehörigen Fangantikörper, die stamm- oder aviditätsbezogenen Unterschiede der Autoantikörper des aktiven EBA-Modells nur begrenzt abbilden. Zur Beurteilung der Erkrankungsaktivität erscheint in diesem Tiermodell die (in-vivo-) Untersuchung der Bindungsverhältnisse an der dermoepidermalen Junktionszone mittels direkter Immunfluoreszenz daher deutlich geeigneter als die (in-vitro-) Serumanalyse mittels ELISA (94). Das hier gezeigte frühe Auftreten unterschiedlicher Subklassen an der dermoepidermalen Junktion empfindlicher SJL/J- (IgG2b, IgG2c) wie resistenter BALB/c-Mäuse (IgG1) legt eine unterschiedliche Regulierung des Immunglobulinklassenwechsels nahe und lässt sich am ehesten auf ein differentes Zytokinmilieu zurückführen (118).

4.3 Die zellulären Reaktionen des drainierenden Lymphknotens differieren in EBA-empfindlichen wie -resistenten Mäusen.

T-Zellen sind für die Initiierung der EBA unerlässlich (79). Über klonale Expansion (T-Zellproliferation) und die Ausbildung einer T-Zell-abhängigen B-Zellantwort (mit Immunglobulinsynthese und -klassenwechsel) entscheidet, neben weiteren kostimulatorischen Signalen, die Erkennung MHC-Klasse II-gebundenen Proteins

durch den T-Zellrezeptor (TCR) spezifischer T-Zellen. Eine starke T-Zellproliferation in SJL/J-Mäusen während der Tage 7 bis 21 p. i. kann daher als sicheres Zeichen einer stattgehabten Ausbildung so genannter „immunologischer Synapsen“ zwischen antigenpräsentierenden Zellen (APCs) und T-Zellen gelten (119, 120). In-vitro-Restimulationsexperimente konnten für das aktive EBA-Modell starke Proliferationsreaktionen von T-Zellen aus SJL/J-Mäusen auf synthetisch generierte Peptidfragmente der Aminosäuren 811-830, 820-839, 883-902 und 892-911 des zur Immunisierung verwendeten mCOL7C-Proteins (Aminosäuren 757-967) demonstrieren, für BALB/c-Tiere sind entsprechende Daten nicht publiziert oder bekannt (79). Jene EBA-resistenten BALB/c-Tiere zeigten in den Experimenten dieser Promotionsschrift eine geringere, aber existente Proliferationsrate, was auf Unterschiede in der T-Zellstimulation hinweist: Dies kann auf ein differierendes MHC-Klasse II-Molekül, Expressionsunterschiede von MHC-Klasse II-Molekülen, unterschiedliche Prozessierung des Antigens mCOL7C, verschiedene TCR-Struktur, kostimulatorische Unterschiede (CD28, Zytokine, Chemokine) oder veränderte Signaltransduktion zurückgehen (121-126). Als wahrscheinlich dürfen jedoch Unterschiede in der Antigenpräsentation zwischen den Stämmen angenommen werden, da sich SJL/J- und BALB/c-Tiere in ihrem Haplotyp des MHC-Genlokus, welcher auch die Antigenpräsentation durch Klasse II-Moleküle kodiert, unterscheiden (78).

Die hier erstmalig nachgewiesenen mCOL7C-spezifischen CD138⁺ Plasmazellen konnten in Gefrierschnitten des drainierenden Lymphknotens allein in dem Kompartiment der Medulla nachgewiesen werden und fanden sich weder in Cortex, noch im Paracortex. Dies bestätigt Vorbefunde zur Histologie reaktiver Lymphknoten (127, 128). Untersuchte Gefrierschnitte der Milz zeigten nur vereinzelt solitäre mCOL7C⁺ CD138⁺ Zellen, was auf einen korrekten, lymphogenen Antigentransport nach subkutaner Injektion hinweist und die Untersuchung des drainierenden Lymphknotens als primären Ort des Toleranzverlusts im aktiven Mausmodell der EBA als valide charakterisiert. Während empfängliche SJL/J-Mäuse mit Krankheitsprogression eine zunehmende Zahl von antigenspezifischen Plasmazellen aufweisen, nimmt die Zahl dieser in resistenten BALB/c-Tieren nach Tag 35 p. i. wieder ab: Ob dies mittelbar oder unmittelbar auf eine unterschiedliche initiale T-Zellproliferation, Unterschiede im Kontakt antigenspezifischer T-Zellen mit antigenspezifischen B-Zellen im Rahmen

der Keimzentrumsreaktion oder auf differentielle Regulation von Plasmazellen (z. B. durch Blimp-1 oder XBP-1) zurückgeführt werden kann, muss offen bleiben (118, 129, 130). Interessanterweise zeigte sich jedoch IFN- γ -Gabe in einem Mausmodell zur autoimmunen Pankreatitis direkt korreliert mit der Zahl CD138-positiver Zellen (131). Eigene Kollokalisationsstudien erbrachten hinsichtlich der zytoplasmatischen CD138-Expression und der dortigen, antikörpervermittelten Bindung von mCOL7C (als Maß für die Synthese mCOL7C-spezifischer Immunglobuline aller Klassen) keine Unterschiede zwischen den Plasmazellen von SJL/J- und BALB/c-Versuchstieren, was tatsächlich für einen Mechanismus der Regulation sprechen könnte, der selektiv die Zahl der Plasmazellen beeinflusst.

4.4 EBA-Empfänglichkeit geht einher mit IFN- γ -Zytokingenexpression.

Zytokine gelten als die wichtigsten Regulatoren des Antikörperklassenwechsels (Class Switch Recombination, CSR) im Rahmen einer von T-Zellen abhängigen Keimzentrumsreaktion follikulärer B-Zellen: Das Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) vermittelt in aktivierten B-Zellen die CSR zur Subklasse IgG2, während Interleukin-4 (IL-4) zu IgG1- und IgE-Bildung führt (118, 132). Beide Zytokine hemmen sich, zumindest partiell, gegenseitig in ihrer Wirkung (133). IFN- γ darf als Schlüsselzytokin von CD4⁺ T-Helferzellen des Typs 1 (Th1-Zellen) gelten, während IL-4-Sekretion klassischerweise mit CD4⁺ Th2-Zellen in Verbindung gebracht wird (80-82). Neben Th1- und Th2-Zellen wurden kürzlich weitere CD4⁺ T-Zellpopulationen mit distinktem Zytokinexpressionsmuster wie z. B. T-Helferzellen des Typs 17 (Th17-Zellen) oder regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) beschrieben und mit zahlreichen Krankheiten autoimmuner Genese assoziiert (134, 135). Direkte Einflüsse dieser Subpopulationen (und deren Zytokine) auf die CSR wurden jedoch noch nicht in der Literatur beschrieben, außerdem scheint die Pathogenese der EBA von Treg-Zellen gänzlich unabhängig zu sein (136). Neuere Studien zeigen ferner, dass die Zytokine IFN- γ und IL-4 auch von anderen Zellen ausgeschüttet werden können: So werden NK-Zellen als IFN- γ -Produzenten und frühe Induktoren einer Th1-ähnlichen Immunantwort im Lymphknoten beschrieben, während follikuläre T-Helferzellen (Tfh-Zellen) während der Keimzentrumsreaktion IL-4 sezernieren können (137, 138). Dieser Befunde wegen soll im weiteren Verlauf der Diskussion von einem *Th1- oder Th2-typischen Zytokinmilieu* gesprochen werden.

Eine erste kinetische Bestimmung der Genexpression der CSR-induzierenden Zytokine IFN- γ und IL-4 im drainierenden Lymphknoten erbrachte eine gute Diskriminationsleistung am Tag 21 p.i. (dem Zeitpunkt der ersten beobachtbaren klinischen Zeichen der EBA), während sich die Expression zu früheren Zeitpunkten uneinheitlich zeigte (n=2). Dies deckt sich mit Literaturstellen, die eine klare, Th1- oder Th2-typische Polarisierung im chronischen Stadium einer Erkrankung beschreiben, während zu Beginn der Lymphozytenaktivierung eher gemischte Profile der Zytokinexpression zu beobachten sind (83). Die hypothetisierte Th1-typische Polarisierung in empfänglichen SJL/J-Mäusen konnte sodann in einem Wiederholungsexperiment (n=8-10) statistisch signifikant bestätigt werden, während resistente BALB/c-Tiere mit einer gemischten, jedoch Th2-typisch dominierten Antwort reagierten. Es fiel auf, dass IL-4 in mCOL7C-immunisierten SJL/J-Tieren, im Vergleich zu Kontrolltieren, unverändert exprimiert wurde, obwohl in Serum und Haut ansteigende IgG1-Titer gemessen werden konnten. In-vitro-Restimulationsexperimente mit T-Zellen von SJL/J-Versuchstieren wiesen jedoch eine IL-4-Bildung zu einem früheren Zeitpunkt nach, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass IL-4 in-vivo zu einem anderen Zeitpunkt als der hier untersuchte exprimiert wird (79). Auch ist es denkbar, dass das auf Kontrollniveau exprimierte IL-4 in SJL/J-Tieren für eine CSR zur IgG1-Subklasse ausreicht.

Durch die Analyse ganzer Lymphknotengefrierschnitte kann keine genauere Aussage zum zytokinexprimierenden Kompartiment gemacht werden, wie es durch die Methode der Laser-Mikrodissektion möglich geworden ist (101). Neuere Literatur belegt jedoch, dass die Wirkung der Zytokine IFN- γ und IL-4 nicht auf einen nur kleinen Reaktionsbereich (z. B. T-Zelle – B-Zelle) beschränkt ist, sondern den gesamten reaktiven Lymphknoten betrifft (139). Unter der Annahme, dass Zytokinexpression und Proteinsekretion korrelieren (wie für IFN- γ in Studien gezeigt), kann bei den vorgestellten Ergebnissen durchaus von einem Th1- oder Th2-typischen, die CSR beeinflussenden Mikromilieu gesprochen werden, zumal die Methode der quantitativen real-time PCR zur Zeit die einzige Möglichkeit darstellt, kleine Änderungen der Zytokinregulation in-vivo zu erfassen (100, 140, 141).

Die hier demonstrierte Polarisierung zu einem Th1- oder Th2-typischen Zytokinmilieu im drainierenden Lymphknoten mCOL7C-immunisierter Mäuse wirft die Frage nach möglichen Ursachen einer unterschiedlichen Regulierung auf. In

Zusammenschau der Erkenntnisse aus den Abschnitten 4.2 und 4.3 liegt es nahe, die Unterschiede in Empfänglichkeit, dermoepidermaler Ablagerung von IgG-Autoantikörpern und Zytokingenexpression von SJL/J- und BALB/c-Tieren übergeordneten, genetischen Abweichungen zuzuordnen, zumal der Haplotyp H2s (SJL/J) des immunregulatorischen MHC-Genlokus mit Empfänglichkeit für die Ausbildung der EBA assoziiert werden konnte, und BALB/c-Tiere einen davon differenten Haplotyp (H2d) aufweisen (78).

4.5 Der MHC-Haplotyp H2s ist assoziiert mit EBA-Empfänglichkeit, dermoepidermaler Ablagerung komplementfixierender IgG2-Autoantikörper, T-Zellproliferation und IFN- γ -Zytokingenexpression.

Sollte der MHC-Haplotyp H2s tatsächlich mit einer Th1-typischen Polarisierung assoziiert sein, so müssten neben Wildtyp-BALB/c-Tieren (H2d) auch solche des C57Bl/6-Stamms (H2b) mit einer von IFN- γ abweichenden Zytokingenexpression reagieren. Die Wiedereinführung des MHC-Haplotyps H2s von SJL/J- in BALB/c- oder C57Bl/6-Mäuse mittels Rückkreuzung (syn. Backcrossing) sollte sodann mit Th1-typischer Immunreaktion nach Immunisierung mit mCOL7C einhergehen. Zur Untersuchung dieser möglichen Assoziation immunisierte der Promovend, in Ermangelung kongener BALB/c-Tiere, kongene C57Bl/6.s-Tiere und Wildtypiere des C57Bl/6-Stamms. Die beobachteten Reaktionen bestätigten die formulierte Hypothese der Assoziation von MHC-Haplotyp H2s und Th1-typischer IFN- γ -Expression: C57Bl/6-Mäuse reagierten mit klinischer Resistenz, vorwiegender IgG1-Ablagerung an der DEJ, fehlender C3-Fixierung und einer Tendenz zur Th2-typischen IL-4-Antwort. Kongene C57Bl/6.s-Tiere hingegen zeigten Empfänglichkeit, IgG2- und C3-Ablagerung an der DEJ sowie eine gemischte Th1-/Th2-typische, jedoch IFN- γ -(Th1-)dominierte Zytokinexpression. Dies lässt eine besondere Bedeutung des genetischen Haplotyps des wichtigen immunregulatorischen MHC-Genlokus in der Pathogenese der EBA vermuten und bestätigt die zuvor gestellte Assoziation von H2s mit Erkrankungsempfänglichkeit sehr anschaulich (78).

Mechanistisch dürfen die hier in-vivo beobachteten T-Zellproliferationen als erster Hinweis auf den im MHC kodierten Einfluss auf die Antigenpräsentation gelten. So konnte in murinen Autoimmunitätsmodellen zum humanen Kollagen IV demonstriert werden, dass Th1-typische IFN- γ -Ausschüttung mit einer hohen

Dichte der Antigenpräsentation und T-Zellproliferation in Mäusen des H2s MHC-Haplotyps einherging, während kongene H2b-Mäuse eine Th2-typische IL-4-Antwort mit einer niedrigen Antigenpräsentationsdichte und Proliferation zeigten (88-91, 121, 142). Diese Befunde fanden ihre Entsprechung in weiteren Modellen zur Untersuchung des Wechselspiels zwischen APC und CD4⁺ T-Zellen: Ein schwaches, nicht jedoch ein starkes TCR-Signal führte (unter CD28-Kostimulation) zur Synthese von IL-4, stärkere TCR-Stimulation führte zu einer IFN- γ -Sekretion (143-146). So könnte die beobachtete gemischte, aber IFN- γ -dominierte Zytokinexpression in empfänglichen C57Bl/6.s-Versuchstieren mit einer intermediären Antigenpräsentationsdichte respektive einem TCR-Signal geringerer Stärke als in SJL/J-Tieren einhergehen. Ob diese oder andere Prozesse, gegebenenfalls in ihrer Kombination, tatsächlich für die Pathogenese der EBA verantwortlich sind, bleibt jedoch Gegenstand weiterer Untersuchungen. Diese sollten auch immunogenetische Methoden umfassen (z. B. Linkage-Analysen), um genauere Aussagen zu möglichen Kandidatengen im MHC-Lokus treffen zu können (147).

Die Unterschiede in der Krankheitsprogression EBA-empfindlicher SJL/J- und C57Bl/6.s-Tiere können zwar mit einer geringer polarisierten Ablagerung komplementfixierender Antikörper der Subklassen IgG2b und IgG2c an der DEJ und der beobachteten, reduzierten C3-Fixierung in C57Bl/6.s-Mäusen erklärt werden, doch ist anzunehmen, dass weitere Ursachen eine Rolle spielen: So ist bekannt, dass kongene Mäuse nach zehn Generationen des Zurückkreuzens wieder zu 99,9 % genetisch identisch mit dem Inzucht-Hintergrundstamm sind, jedoch auf- und abwärts des eingeführten Genlokus ca. 10 Centimorgan (cM) des Donorgenoms mit anderen Genen oft unbekannter Funktion verbleiben (147). Auch nehmen in zahlreichen Erkrankungen autoimmuner Genese der Antikörperbildung und -ablagerung nachgeschaltete Mechanismen, wie z. B. die Bindung der IgG-Immunkomplexe an aktivierende wie inhibierende Fc γ -Rezeptoren leukozytärer Zellen, einen erheblichen Einfluss auf die Entwicklung des Phänotyps (148, 149).

4.6 Der hochaffine Fc γ ₁-Rezeptor ist nur in Leukozyten EBA-empfindlicher SJL/J-Tiere stark exprimiert.

Fc γ -Rezeptoren werden auf leukozytären Zellen exprimiert und können, nach Bindung des Fc-Teils von Antikörpern der Klasse IgG, sowohl aktivierende (Fc γ R₁,

$Fc\gamma R_{III}$, $Fc\gamma R_{IV}$), als auch inhibierende ($Fc\gamma R_{IIb}$) Signale^{§§} vermitteln (148). Sie ermöglichen der jeweiligen Effektorzelle somit, je nach Koexpression der einzelnen Rezeptoren, nicht nur die Integration aktivierender wie inhibitorischer Signale und eine Balancierung möglicher Effektorfunktionen, sondern sie verbinden auch den adaptiven (IgG-Antikörper) mit dem angeborenen Teil des Immunsystems (Granulozyten, Monozyten): Die Subklasse IgG1 bindet selektiv den niedrig affinen, aktivierenden $Fc\gamma R_{III}$ und den inhibitorischen $Fc\gamma R_{IIb}$ -Rezeptor, jedoch mit einer Präferenz für den $Fc\gamma R_{IIb}$ -Rezeptor ($Fc\gamma R_{IIb} > Fc\gamma R_{III}$). IgG2a (und das Pendant IgG2c) bindet präferentiell an den hoch affinen $Fc\gamma R_I$ - und den intermediär affinen $Fc\gamma R_{IV}$ -Rezeptor, seltener an die Rezeptoren $Fc\gamma R_{III}$ und $Fc\gamma R_{IIb}$. IgG2b-Antikörper verhalten sich ähnlich wie solche der Subklassen IgG2a und IgG2c bis auf die Tatsache, dass IgG2b nicht an den hoch affinen $Fc\gamma R_I$ -Rezeptor binden kann (82, 148).

Dies bedeutet für die in Abschnitt 3.6 vorgestellten Ergebnisse, dass die Initiierung eines EBA-Phänotyps in C57Bl/6.s-Mäusen durch IgG2b- und IgG2c-Autoantikörper allein auf den intermediär affinen $Fc\gamma R_{IV}$ -Rezeptor beschränkt ist, während die gleichen Subklassen in SJL/J-Mäusen ihre immunpathologische Wirkung sowohl über intermediär affine $Fc\gamma R_{IV}$ -, als auch über hoch affine $Fc\gamma R_I$ -Rezeptoren neutrophiler Granulozyten vermitteln können ($Fc\gamma R_I$ wird auf allen Leukozyten exprimiert, $Fc\gamma R_{IV}$ nur nicht auf T- und B-Lymphozyten) (82, 148). Die beobachteten Unterschiede in der Krankheitsprogression von SJL/J- wie C57Bl/6.s-Tieren können mit den hier gestellten Befunden hinreichend erklärt werden und zeigen, dass auch Gene außerhalb des MHC-Lokus in die EBA-Pathogenese involviert sind (die $Fc\gamma$ -Rezeptoren der Maus werden auf Chromosom 1 kodiert).

Interessanterweise kann die Th1-/Th2-typische Polarisierung von Immunreaktionen auch die Regulation der $Fc\gamma$ -Rezeptoren beeinflussen: $IFN-\gamma$ kann aktivierende Rezeptorklassen herauf- und inhibierende herunterregulieren, während IL-4 die gegenteiligen Effekte vermittelt (82). Somit werden Klassenwechsel und Expression von $Fc\gamma$ -Rezeptoren durch dieselben Zytokine reguliert. Diesbezügliche Aussagen lassen sich jedoch für die vorgestellten Ergebnisse nicht treffen, da hier

^{§§} Hier werden die murinen $Fc\gamma R$ -Klassen mit ihren jeweiligen Wirkungen genannt. Aktivierende Signale werden über ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) auf rezeptorassoziierten γ -Ketten, inhibierende über ITIMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) auf dem zytoplasmatischen Teil der $Fc\gamma R_{IIb}$ -Kette vermittelt. ITAMs vermitteln die weitere Signaltransduktion über SYK, PI3K und SOS, während ITIMs über SHIP oder BTK und JNK wirken können. Ein γ -Ketten-Knockout führt zum Verlust jeglicher aktivierender Wirkung.

periphere (und nicht lymphonodale) Leukozyten zur Bestimmung der Fc γ -Rezeptorexpression analysiert wurden. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass so ein repräsentatives Abbild der Expression in denjenigen Leukozyten geliefert werden kann, die, nach Extravasation und Emigration, an der DEJ die immunpathologischen Prozesse der EBA vermitteln.

5 Zusammenfassung

Die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) gehört zu der Gruppe der subepidermal blasenbildenden Autoimmundermatosen und ist durch zirkulierende wie gebundene IgG-Antikörper gegen einen wichtigen Strukturbestandteil der dermoepidermalen Junktion (DEJ), das Kollagen VII, charakterisiert. Es ist bekannt, dass diese Autoantikörper präferentiell an die nichtkollagene Domäne 1 (NC1) des Proteins binden und über den Fc-Teil immunpathologische Wirkungen wie Komplementbindung und Neutrophilenattraktion vermitteln können. Folglich wurde angenommen, dass die Entwicklung eines Phänotyps mit einem Übergewicht komplementfixierender IgG-Autoantikörper einhergeht und dies auf eine Th1-typische Regulation zurückgeführt werden kann.

Genauere Daten zur Kinetik dieser Autoantikörper in Serum und Haut, differenziert nach IgG-Subklassen mit komplementfixierenden und nicht komplementfixierenden Eigenschaften, und einem möglichen Regulationsmechanismus fehlten jedoch bislang. Nach Etablierung eines vorbeschriebenen Tiermodells, welches mit Immunisierung von Mäusen mit einem EBA-induzierenden, rekombinanten NC1-Fragment des murinen Kollagen VII das in-vivo-Studium früherer Schritte in der Pathophysiologie ermöglicht, konnte nun in kinetischen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Klinik tatsächlich mit dermoepidermaler Bindung überwiegend komplementfixierender IgG2b- und IgG2c-Antikörper und Th1-typischer Genexpression von Interferon- γ (IFN- γ) am Ort des Toleranzverlusts korreliert. EBA-Resistenz erwies sich in diesen Analysen mit überwiegender Bindung nicht komplementfixierender IgG1-Autoantikörper und einer Th2-typischen Interleukin 4-Genexpression assoziiert. In weiterführenden Untersuchungen und unter Einsatz kongener Versuchstiere konnte nicht nur gezeigt werden, dass Erkrankung, Bindung überwiegend komplementfixierender IgG2-Autoantikörper und IFN- γ -Genexpression mit dem Haplotyp H2s des wichtigen immunregulatorischen MHC-Genlokus von Mäusen korreliert sind, sondern auch, dass das Expressionsniveau aktivierender, nicht im MHC-Lokus kodierter Fc γ -Rezeptoren der Klassen I und IV mit der Erkrankungsschwere zusammenhängt. Diese Ergebnisse bilden eine wichtige methodische wie inhaltliche Grundlage für neue Experimente zu einzelnen Mechanismen der Pathogenese und zur Modulation des Krankheitsverlaufes der EBA.

6 Literaturverzeichnis

1. Sinha AA, Lopez MT, McDevitt HO: *Autoimmune diseases: the failure of self tolerance*. Science 248, 1380-1388 (1990).
2. Shapira Y, Agmon-Levin N, Shoenfeld Y: *Defining and analyzing geoepidemiology and human autoimmunity*. J Autoimmun 34, J168-177 (2010).
3. Bhol KC, Goss L, Kumari S, Colon JE, Ahmed AR: *Autoantibodies to human alpha6 integrin in patients with oral pemphigoid*. J Dent Res 80, 1711-1715 (2001).
4. Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P: *Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion*. Immunity 13, 829-840 (2000).
5. Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ: *From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease*. Nat Rev Immunol 1, 147-153 (2001).
6. Anderson AC, Nicholson LB, Legge KL, Turchin V, Zaghouani H, Kuchroo VK: *High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naive mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire*. J Exp Med 191, 761-770 (2000).
7. Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, Raus J, Weiner HL, Hafler DA: *Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis*. J Exp Med 179, 973-984 (1994).
8. Goldrath AW, Bevan MJ: *Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire*. Nature 402, 255-262 (1999).
9. Silverstein AM, Rose NR: *There is only one immune system! The view from immunopathology*. Semin Immunol 12, 173-178; discussion 257-344 (2000).
10. Encinas JA, Kuchroo VK: *Mapping and identification of autoimmunity genes*. Curr Opin Immunol 12, 691-697 (2000).
11. Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P, Plenge RM, Vyse TJ, Rioux JD: *Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis*. PLoS Genet 4, e1000024 (2008).
12. DeFranco AL, Locksley RM, Robertson M: *The MHC and Polymorphism of MHC Molecules*. In: DeFranco AL, Locksley RM, Robertson M: Primers in biology - Immunity. 1. Auflage, S. 102, New Science Press, London, UK, 2007.
13. Wherrett DK, Daneman D: *Prevention of type 1 diabetes*. Endocrinol Metab Clin North Am 38, 777-790 (2009).

14. Handel AE, Giovannoni G, Ebers GC, Ramagopalan SV: *Environmental factors and their timing in adult-onset multiple sclerosis*. Nat Rev Neurol 6, 156-166 (2010).
15. Warren SJ, Lin MS, Giudice GJ, Hoffmann RG, Hans-Filho G, Aoki V, Rivitti EA, Santos V, Diaz LA: *The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil*. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. N Engl J Med 343, 23-30 (2000).
16. Hilario-Vargas J, Dasher DA, Li N, Aoki V, Hans-Filho G, dos Santos V, Qaqish BF, Rivitti EA, Diaz LA: *Prevalence of anti-desmoglein-3 antibodies in endemic regions of Fogo selvagem in Brazil*. J Invest Dermatol 126, 2044-2048 (2006).
17. Shahrizaila N, Yuki N: *Guillain-barre syndrome animal model: the first proof of molecular mimicry in human autoimmune disorder*. J Biomed Biotechnol, 829129 (2011).
18. Guilherme L, Cunha-Neto E, Coelho V, Snitcowsky R, Pomerantzeff PM, Assis RV, Pedra F, Neumann J, Goldberg A, Patarroyo ME, et al.: *Human heart-infiltrating T-cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins*. Circulation 92, 415-420 (1995).
19. Guilherme L, Fae KC, Oshiro SE, Tanaka AC, Pomerantzeff PM, Kalil J: *Rheumatic fever: how S. pyogenes-primed peripheral T cells trigger heart valve lesions*. Ann N Y Acad Sci 1051, 132-140 (2005).
20. Katz U, Zandman-Goddard G: *Drug-induced lupus: an update*. Autoimmun Rev 10, 46-50 (2010).
21. Davidson A, Diamond B: *Autoimmune diseases*. N Engl J Med 345, 340-350 (2001).
22. Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR: *Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion*. Cell 67, 869-877 (1991).
23. Diaz LA, Ratrie H, 3rd, Saunders WS, Futamura S, Squiquera HL, Anhalt GJ, Giudice GJ: *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 86, 1088-1094 (1990).
24. Dieterich W, Laag E, Bruckner-Tuderman L, Reunala T, Karpati S, Zagoni T, Riecken EO, Schuppan D: *Antibodies to tissue transglutaminase as serologic markers in patients with dermatitis herpetiformis*. J Invest Dermatol 113, 133-136 (1999).
25. Domloge-Hultsch N, Gammon WR, Briggaman RA, Gil SG, Carter WG, Yancey KB: *Epiligrin, the major human keratinocyte integrin ligand, is a target in both an acquired autoimmune and an inherited subepidermal blistering skin disease*. J Clin Invest 90, 1628-1633 (1992).

26. Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA: *Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180*. J Invest Dermatol 99, 243-250 (1992).
27. Hashimoto T, Kiyokawa C, Mori O, Miyasato M, Chidgey MA, Garrod DR, Kobayashi Y, Komori K, Ishii K, Amagai M, Nishikawa T: *Human desmocollin 1 (Dsc1) is an autoantigen for the subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus*. J Invest Dermatol 109, 127-131 (1997).
28. Karpati S, Amagai M, Prussick R, Cehrs K, Stanley JR: *Pemphigus vulgaris antigen, a desmoglein type of cadherin, is localized within keratinocyte desmosomes*. J Cell Biol 122, 409-415 (1993).
29. Kirtschig G, Marinkovich MP, Burgeson RE, Yancey KB: *Anti-basement membrane autoantibodies in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid bind the alpha subunit of laminin 5*. J Invest Dermatol 105, 543-548 (1995).
30. Korman NJ, Eyre RW, Klaus-Kovtun V, Stanley JR: *Demonstration of an adhering-junction molecule (plakoglobin) in the autoantigens of pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris*. N Engl J Med 321, 631-635 (1989).
31. Marinkovich MP, Taylor TB, Keene DR, Burgeson RE, Zone JJ: *LAD-1, the linear IgA bullous dermatosis autoantigen, is a novel 120-kDa anchoring filament protein synthesized by epidermal cells*. J Invest Dermatol 106, 734-738 (1996).
32. Nousari HC, Rencic A, Hsu R, Yancey KB, Anhalt GJ: *Anti-epiligrin cicatricial pemphigoid with antibodies against the gamma2 subunit of laminin 5*. Arch Dermatol 135, 173-176 (1999).
33. Rose C, Dieterich W, Brocker EB, Schuppan D, Zillikens D: *Circulating autoantibodies to tissue transglutaminase differentiate patients with dermatitis herpetiformis from those with linear IgA disease*. J Am Acad Dermatol 41, 957-961 (1999).
34. Stanley JR, Hawley-Nelson P, Yuspa SH, Shevach EM, Katz SI: *Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia*. Cell 24, 897-903 (1981).
35. Stanley JR, Yaar M, Hawley-Nelson P, Katz SI: *Pemphigus antibodies identify a cell surface glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes*. J Clin Invest 70, 281-288 (1982).
36. 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 310, 1007-1013 (1984).
37. Mihai S, Sitaru C: *Immunopathology and molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases*. J Cell Mol Med 11, 462-481 (2007).
38. Lüllmann-Rauch R: *Binde- und Stützgewebe*. In: Lüllmann-Rauch R: Histologie. 1. Auflage, S. 94, Thieme, Stuttgart, 2003.

39. de Pereda JM, Ortega E, Alonso-Garcia N, Gomez-Hernandez M, Sonnenberg A: *Advances and perspectives of the architecture of hemidesmosomes: lessons from structural biology*. Cell Adh Migr 3, 361-364 (2009).
40. Green KJ, Simpson CL: *Desmosomes: new perspectives on a classic*. J Invest Dermatol 127, 2499-2515 (2007).
41. Waschke J: *The desmosome and pemphigus*. Histochem Cell Biol 130, 21-54 (2008).
42. Hertl M, Niedermeier A, Borradori L: *Bullöse Autoimmundermatosen*. Ther Umsch 67, 465-482 (2010).
43. Goldsby RA, Kindt TJ, Kuby J, Osborne BA: *Antibodies: Structure and Function*. In: Goldsby RA, Kindt TJ, Kuby J, Osborne BA: *Kuby Immunology*. 4. Auflage, S. 76, W.H. Freeman, New York, 2000.
44. Li N, Zhao M, Wang J, Liu Z, Diaz LA: *Involvement of the apoptotic mechanism in pemphigus foliaceus autoimmune injury of the skin*. J Immunol 182, 711-717 (2009).
45. Liu Z, Li N, Diaz LA: *Immunopathological mechanisms of acantholysis in pemphigus vulgaris: an explanation by ultrastructural observations*. J Invest Dermatol 122, XIII-XIV (2004).
46. Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A: *Maintenance of serum antibody levels*. Annu Rev Immunol 23, 367-386 (2005).
47. Wang X, Bregegere F, Frusic-Zlotkin M, Feinmesser M, Michel B, Milner Y: *Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins*. Apoptosis 9, 131-143 (2004).
48. Wentworth AD, Jones LH, Wentworth P, Jr., Janda KD, Lerner RA: *Antibodies have the intrinsic capacity to destroy antigens*. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 10930-10935 (2000).
49. Wentworth P, Jr., McDunn JE, Wentworth AD, Takeuchi C, Nieva J, Jones T, Bautista C, Ruedi JM, Gutierrez A, Janda KD, Babior BM, Eschenmoser A, Lerner RA: *Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation*. Science 298, 2195-2199 (2002).
50. Sitaru C, Zillikens D: *Mechanisms of blister induction by autoantibodies*. Exp Dermatol 14, 861-875 (2005).
51. Mihai S, Chiriac MT, Herrero-Gonzalez JE, Goodall M, Jefferis R, Savage CO, Zillikens D, Sitaru C: *IgG4 autoantibodies induce dermal-epidermal separation*. J Cell Mol Med 11, 1117-1128 (2007).
52. Mihai S, Chiriac MT, Takahashi K, Thurman JM, Holers VM, Zillikens D, Botto M, Sitaru C: *The alternative pathway of complement activation is critical for blister induction in experimental epidermolysis bullosa acquisita*. J Immunol 178, 6514-6521 (2007).

53. Sitaru C, Chiriac MT, Mihai S, Buning J, Gebert A, Ishiko A, Zillikens D: *Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice.* J Immunol 177, 3461-3468 (2006).
54. Sitaru C, Mihai S, Zillikens D: *The relevance of the IgG subclass of autoantibodies for blister induction in autoimmune bullous skin diseases.* Arch Dermatol Res 299, 1-8 (2007).
55. Hendrix JD, Mangum KL, Zone JJ, Gammon WR: *Cutaneous IgA deposits in bullous diseases function as ligands to mediate adherence of activated neutrophils.* J Invest Dermatol 94, 667-672 (1990).
56. Sitaru C, Kromminga A, Hashimoto T, Brocker EB, Zillikens D: *Autoantibodies to type VII collagen mediate Fcγ-dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin.* Am J Pathol 161, 301-311 (2002).
57. Lazarova Z, Hsu R, Briggaman RA, Yancey KB: *Fab fragments directed against laminin 5 induce subepidermal blisters in neonatal mice.* Clin Immunol 95, 26-32 (2000).
58. 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 7, 434-440 (2009).
59. Altmeyer P, Bacharach-Buhles M: *Epidermolysis bullosa acquisita.* In: Altmeyer P, Bacharach-Buhles M: Enzyklopädie Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin. 1. Auflage, S. 459, Springer, Berlin, 2002.
60. Dahl MG: *Epidermolysis bullosa acquisita--a sign of cicatricial pemphigoid?* Br J Dermatol 101, 475-484 (1979).
61. Gammon WR, Briggaman RA, Wheeler CE, Jr.: *Epidermolysis bullosa acquisita presenting as an inflammatory bullous disease.* J Am Acad Dermatol 7, 382-387 (1982).
62. Gammon WR, Briggaman RA, Woodley DT, Heald PW, Wheeler CE, Jr.: *Epidermolysis bullosa acquisita--a pemphigoid-like disease.* J Am Acad Dermatol 11, 820-832 (1984).
63. Roenigk HH, Jr., Ryan JG, Bergfeld WF: *Epidermolysis bullosa acquisita. Report of three cases and review of all published cases.* Arch Dermatol 103, 1-10 (1971).
64. Schmidt E, Hopfner B, Chen M, Kuhn C, Weber L, Brocker EB, Bruckner-Tuderman L, Zillikens D: *Childhood epidermolysis bullosa acquisita: a novel variant with reactivity to all three structural domains of type VII collagen.* Br J Dermatol 147, 592-597 (2002).
65. Mayuzumi M, Akiyama M, Nishie W, Ukae S, Abe M, Sawamura D, Hashimoto T, Shimizu H: *Childhood epidermolysis bullosa acquisita with autoantibodies against the noncollagenous 1 and 2 domains of type VII*

- collagen: case report and review of the literature*. Br J Dermatol 155, 1048-1052 (2006).
66. Park SB, Cho KH, Youn JL, Hwang DH, Kim SC, Chung JH: *Epidermolysis bullosa acquisita in childhood--a case mimicking chronic bullous dermatosis of childhood*. Clin Exp Dermatol 22, 220-222 (1997).
 67. Gammon WR, Heise ER, Burke WA, Fine JD, Woodley DT, Briggaman RA: *Increased frequency of HLA-DR2 in patients with autoantibodies to epidermolysis bullosa acquisita antigen: evidence that the expression of autoimmunity to type VII collagen is HLA class II allele associated*. J Invest Dermatol 91, 228-232 (1988).
 68. Yaoita H, Briggaman RA, Lawley TJ, Provost TT, Katz SI: *Epidermolysis bullosa acquisita: ultrastructural and immunological studies*. J Invest Dermatol 76, 288-292 (1981).
 69. Stanley JR, Rubinstein N, Klaus-Kovtun V: *Epidermolysis bullosa acquisita antigen is synthesized by both human keratinocytes and human dermal fibroblasts*. J Invest Dermatol 85, 542-545 (1985).
 70. Bruckner-Tuderman L: *Can type VII collagen injections cure dystrophic epidermolysis bullosa?* Mol Ther 17, 6-7 (2009).
 71. Shimizu H, Ishiko A, Masunaga T, Kurihara Y, Sato M, Bruckner-Tuderman L, Nishikawa T: *Most anchoring fibrils in human skin originate and terminate in the lamina densa*. Lab Invest 76, 753-763 (1997).
 72. 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 81, 683-687 (1988).
 73. Chen M, Keene DR, Costa FK, Tahk SH, Woodley DT: *The carboxyl terminus of type VII collagen mediates antiparallel dimer formation and constitutes a new antigenic epitope for epidermolysis Bullosa acquisita autoantibodies*. J Biol Chem 276, 21649-21655 (2001).
 74. Remington J, Chen M, Burnett J, Woodley DT: *Autoimmunity to type VII collagen: epidermolysis bullosa acquisita*. Curr Dir Autoimmun 10, 195-205 (2008).
 75. Rose NR, Bona C: *Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited)*. Immunol Today 14, 426-430 (1993).
 76. Woodley DT, Ram R, Doostan A, Bandyopadhyay P, Huang Y, Remington J, Hou Y, Keene DR, Liu Z, Chen M: *Induction of epidermolysis bullosa acquisita in mice by passive transfer of autoantibodies from patients*. J Invest Dermatol 126, 1323-1330 (2006).
 77. Bernard P, Prost C, Aucouturier P, Durepaire N, Denis F, Bonnetblanc JM: *The subclass distribution of IgG autoantibodies in cicatricial pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita*. J Invest Dermatol 97, 259-263 (1991).

78. Ludwig RJ, Recke A, Bieber K, Muller S, Marques Ade C, Banczyk D, Hirose M, Kasperkiewicz M, Ishii N, Schmidt E, Westermann J, Zillikens D, Ibrahim SM: *Generation of antibodies of distinct subclasses and specificity is linked to H2s in an active mouse model of epidermolysis bullosa acquisita*. J Invest Dermatol 131, 167-176 (2011).
79. Sitaru AG, Sesarman A, Mihai S, Chiriac MT, Zillikens D, Hultman P, Solbach W, Sitaru C: *T cells are required for the production of blister-inducing autoantibodies in experimental epidermolysis bullosa acquisita*. J Immunol 184, 1596-1603 (2010).
80. Coffman RL, Leberman DA, Rothman P: *Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching*. Adv Immunol 54, 229-270 (1993).
81. Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JF, Jr., Beckmann MP, Park LS, Schooley KA, Coffman RL, Mosmann TR, Paul WE: *Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection*. Annu Rev Immunol 8, 303-333 (1990).
82. Nimmerjahn F, Ravetch JV: *Fcγ receptors: old friends and new family members*. Immunity 24, 19-28 (2006).
83. Abbas AK, Murphy KM, Sher A: *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature 383, 787-793 (1996).
84. Hussain R, Dawood G, Abrar N, Toossi Z, Minai A, Dojki M, Ellner JJ: *Selective increases in antibody isotypes and immunoglobulin G subclass responses to secreted antigens in tuberculosis patients and healthy household contacts of the patients*. Clin Diagn Lab Immunol 2, 726-732 (1995).
85. Schroeder HW, Jr., Cavacini L: *Structure and function of immunoglobulins*. J Allergy Clin Immunol 125, S41-52 (2010).
86. Flavell RA, Allen H, Burkly LC, Sherman DH, Waneck GL, Widera G: *Molecular biology of the H-2 histocompatibility complex*. Science 233, 437-443 (1986).
87. ImMunoGeneTics-Informationssystem; <http://imgt.cines.fr> (Tag des Zugriffs: 25.01.2011)
88. Matthews VB, Christiansen FT, Price P: *Lymphocytes from H2b mice produce lower levels of several cytokines than congenic H2d or H2k mice*. Immunol Cell Biol 78, 247-253 (2000).
89. Matthews VB, Price P: *The H2(b) haplotype modifies the production of pro-inflammatory cytokines: implications for immunopathology*. Eur Cytokine Netw 11, 640-646 (2000).
90. Murray JS, Pfeiffer C, Madri J, Bottomly K: *Major histocompatibility complex (MHC) control of CD4 T cell subset activation. II. A single peptide induces either humoral or cell-mediated responses in mice of distinct MHC genotype*. Eur J Immunol 22, 559-565 (1992).

91. Pfeiffer C, Murray J, Madri J, Bottomly K: *Selective activation of Th1- and Th2-like cells in vivo--response to human collagen IV*. Immunol Rev 123, 65-84 (1991).
92. Sitaru C, Mihai S, Otto C, Chiriac MT, Hausser I, Dotterweich B, Saito H, Rose C, Ishiko A, Zillikens D: *Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen*. J Clin Invest 115, 870-878 (2005).
93. Van den Broeck W, Derore A, Simoens P: *Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrl mice*. J Immunol Methods 312, 12-19 (2006).
94. Klinger A, Gebert A, Bieber K, Kalies K, Ager A, Bell EB, Westermann J: *Cyclical expression of L-selectin (CD62L) by recirculating T cells*. Int Immunol 21, 443-455 (2009).
95. Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G: *Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker*. J Invest Dermatol 78, 206-209 (1982).
96. Ludwig RJ, Zollner TM, Santoso S, Hardt K, Gille J, Baatz H, Johann PS, Pfeffer J, Radeke HH, Schon MP, Kaufmann R, Boehncke WH, Podda M: *Junctional adhesion molecules (JAM)-B and -C contribute to leukocyte extravasation to the skin and mediate cutaneous inflammation*. J Invest Dermatol 125, 969-976 (2005).
97. Martin RM, Brady JL, Lew AM: *The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice*. J Immunol Methods 212, 187-192 (1998).
98. Bustin SA: *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol 25, 169-193 (2000).
99. Livak KJ, Schmittgen TD: *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods 25, 402-408 (2001).
100. Kalies K, Blessenohl M, Nietsch J, Westermann J: *T cell zones of lymphoid organs constitutively express Th1 cytokine mRNA: specific changes during the early phase of an immune response*. J Immunol 176, 741-749 (2006).
101. Kalies K, Konig P, Zhang YM, Deierling M, Barthelmann J, Stamm C, Westermann J: *Nonoverlapping expression of IL10, IL12p40, and IFNgamma mRNA in the marginal zone and T cell zone of the spleen after antigenic stimulation*. J Immunol 180, 5457-5465 (2008).
102. Westermann J, Bode U, Sahle A, Speck U, Karin N, Bell EB, Kalies K, Gebert A: *Naive, effector, and memory T lymphocytes efficiently scan dendritic cells in vivo: contact frequency in T cell zones of secondary lymphoid organs does not depend on LFA-1 expression and facilitates survival of effector T cells*. J Immunol 174, 2517-2524 (2005).

103. Baudino L, Azeredo da Silveira S, Nakata M, Izui S: *Molecular and cellular basis for pathogenicity of autoantibodies: lessons from murine monoclonal autoantibodies*. Springer Semin Immunopathol 28, 175-184 (2006).
104. 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 212, 56-65 (2007).
105. Pangburn MK, Ferreira VP, Cortes C: *Discrimination between host and pathogens by the complement system*. Vaccine 26 Suppl 8, 115-21 (2008).
106. Klos A, Tenner AJ, Johswich KO, Ager RR, Reis ES, Kohl J: *The role of the anaphylatoxins in health and disease*. Mol Immunol 46, 2753-2766 (2009).
107. Thurman JM, Holers VM: *The central role of the alternative complement pathway in human disease*. J Immunol 176, 1305-1310 (2006).
108. Wirthmueller U, Dewald B, Thelen M, Schafer MK, Stover C, Whaley K, North J, Eggleton P, Reid KB, Schwaebler WJ: *Properdin, a positive regulator of complement activation, is released from secondary granules of stimulated peripheral blood neutrophils*. J Immunol 158, 4444-4451 (1997).
109. Camous L, Roumenina L, Bigot S, Brachemi S, Fremeaux-Bacchi V, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L: *Complement alternative pathway acts as a positive feedback amplification of neutrophil activation*. Blood (2010).
110. Shashidharamurthy R, Hennigar RA, Fuchs S, Palaniswami P, Sherman M, Selvaraj P: *Extravasations and emigration of neutrophils to the inflammatory site depend on the interaction of immune-complex with Fcγ receptors and can be effectively blocked by decoy Fcγ receptors*. Blood 111, 894-904 (2008).
111. Mayadas TN, Tsokos GC, Tsuboi N: *Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury*. Circulation 120, 2012-2024 (2009).
112. Klinke A, Nussbaum C, Kubala L, Friedrichs K, Rudolph TK, Rudolph V, Paust HJ, Schroder C, Benten D, Lau D, Szocs K, Furtmuller PG, Heeringa P, Sydow K, Duchstein HJ, Ehmke H, Schumacher U, Meinertz T, Sperandio M, Baldus S: *Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces*. Blood (2010).
113. Kasperkiewicz M, Hirose M, Recke A, Schmidt E, Zillikens D, Ludwig RJ: *Clearance rates of circulating and tissue-bound autoantibodies to type VII collagen in experimental epidermolysis bullosa acquisita*. Br J Dermatol 162, 1064-1070 (2010).
114. Petrushina I, Tran M, Sadzikava N, Ghochikyan A, Vasilevko V, Agadjanyan MG, Cribbs DH: *Importance of IgG2c isotype in the immune response to beta-amyloid in amyloid precursor protein/transgenic mice*. Neurosci Lett 338, 5-8 (2003).

115. Macdonald RA, Hosking CS, Jones CL: *The measurement of relative antibody affinity by ELISA using thiocyanate elution*. J Immunol Methods 106, 191-194 (1988).
116. Butler JE: *Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays*. Methods 22, 4-23 (2000).
117. Underwood PA: *Problems and pitfalls with measurement of antibody affinity using solid phase binding in the ELISA*. J Immunol Methods 164, 119-130 (1993).
118. McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG: *Antigen-specific memory B cell development*. Annu Rev Immunol 23, 487-513 (2005).
119. Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, Somersalo K, Sims TN, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML: *The immunological synapse*. Annu Rev Immunol 19, 375-396 (2001).
120. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML: *The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation*. Science 285, 221-227 (1999).
121. Murray JS: *How the MHC selects Th1/Th2 immunity*. Immunol Today 19, 157-163 (1998).
122. Felix NJ, Suri A, Salter-Cid L, Nadler SG, Gujrathi S, Corbo M, Aranda R: *Targeting lymphocyte co-stimulation: from bench to bedside*. Autoimmunity 43, 514-525 (2010).
123. van der Merwe PA, Dushek O: *Mechanisms for T cell receptor triggering*. Nat Rev Immunol 11, 47-55 (2011).
124. Deng L, Mariuzza RA: *Recognition of self-peptide-MHC complexes by autoimmune T-cell receptors*. Trends Biochem Sci 32, 500-508 (2007).
125. Nicholson MJ, Hahn M, Wucherpfennig KW: *Unusual features of self-peptide/MHC binding by autoimmune T cell receptors*. Immunity 23, 351-360 (2005).
126. Wucherpfennig KW, Call MJ, Deng L, Mariuzza R: *Structural alterations in peptide-MHC recognition by self-reactive T cell receptors*. Curr Opin Immunol 21, 590-595 (2009).
127. van der Valk P, Meijer CJ: *The histology of reactive lymph nodes*. Am J Surg Pathol 11, 866-882 (1987).
128. Willard-Mack CL: *Normal structure, function, and histology of lymph nodes*. Toxicol Pathol 34, 409-424 (2006).
129. Calame KL, Lin KI, Tunyaplin C: *Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells*. Annu Rev Immunol 21, 205-230 (2003).

130. Shapiro-Shelef M, Calame K: *Regulation of plasma-cell development*. Nat Rev Immunol 5, 230-242 (2005).
131. Fitzner B, Holzhueter SA, Ibrahim S, Nizze H, Jaster R: *Interferon-gamma treatment accelerates and aggravates autoimmune pancreatitis in the MRL/Mp-mouse*. Pancreatology 9, 233-239 (2009).
132. Toellner KM, Luther SA, Sze DM, Choy RK, Taylor DR, MacLennan IC, Acha-Orbea H: *T helper 1 (Th1) and Th2 characteristics start to develop during T cell priming and are associated with an immediate ability to induce immunoglobulin class switching*. J Exp Med 187, 1193-1204 (1998).
133. Hasbold J, Hong JS, Kehry MR, Hodgkin PD: *Integrating signals from IFN-gamma and IL-4 by B cells: positive and negative effects on CD40 ligand-induced proliferation, survival, and division-linked isotype switching to IgG1, IgE, and IgG2a*. J Immunol 163, 4175-4181 (1999).
134. Steinman L: *A rush to judgment on Th17*. J Exp Med 205, 1517-1522 (2008).
135. O'Shea JJ, Paul WE: *Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells*. Science 327, 1098-1102 (2010).
136. Chen L, Peterson JD, Zheng WY, Lin SX, Chan LS: *Autoimmunity to type VII collagen in SKH1 mice is independent of regulatory T cells*. Clin Exp Immunol 145, 322-331 (2006).
137. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F: *Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming*. Nat Immunol 5, 1260-1265 (2004).
138. Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM: *Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire*. Nat Immunol 10, 385-393 (2009).
139. Perona-Wright G, Mohrs K, Mohrs M: *Sustained signaling by canonical helper T cell cytokines throughout the reactive lymph node*. Nat Immunol 11, 520-526 (2010).
140. Gupta AK, Rusterholz C, Holzgreve W, Hahn S: *Constant IFN-gamma mRNA to protein ratios in cord and adult blood T cells suggests regulation of IFN-gamma expression in cord blood T cells occurs at the transcriptional level*. Clin Exp Immunol 140, 282-288 (2005).
141. Holscher C, Holscher A, Ruckerl D, Yoshimoto T, Yoshida H, Mak T, Saris C, Ehlers S: *The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis*. J Immunol 174, 3534-3544 (2005).
142. Schountz T, Kasselmann JP, Martinson FA, Brown L, Murray JS: *MHC genotype controls the capacity of ligand density to switch T helper (Th)-1/Th-2 priming in vivo*. J Immunol 157, 3893-3901 (1996).

143. Tao X, Constant S, Jorritsma P, Bottomly K: *Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation*. J Immunol 159, 5956-5963 (1997).
144. Paul WE: *What determines Th2 differentiation, in vitro and in vivo?* Immunol Cell Biol 88, 236-239 (2010).
145. Celli S, Garcia Z, Bousso P: *CD4 T cells integrate signals delivered during successive DC encounters in vivo*. J Exp Med 202, 1271-1278 (2005).
146. Henrickson SE, Mempel TR, Mazo IB, Liu B, Artyomov MN, Zheng H, Peixoto A, Flynn MP, Senman B, Junt T, Wong HC, Chakraborty AK, von Andrian UH: *T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation*. Nat Immunol 9, 282-291 (2008).
147. Rogner UC, Avner P: *Congenetic mice: cutting tools for complex immune disorders*. Nat Rev Immunol 3, 243-252 (2003).
148. Nimmerjahn F, Ravetch JV: *Fcγ receptors as regulators of immune responses*. Nat Rev Immunol 8, 34-47 (2008).
149. Tsuboi N, Asano K, Lauterbach M, Mayadas TN: *Human neutrophil Fcγ receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases*. Immunity 28, 833-846 (2008).

Statistik zu der Aktualität der verwendeten Literaturstellen:

- 57 Quellen aus den Jahren 2011 – 2006
- 29 Quellen aus den Jahren 2005 – 2001
- 29 Quellen aus den Jahren 2000 – 1996
- 14 Quellen aus den Jahren 1995 – 1991
- 20 Quellen aus den Jahren 1990 und älter

7 Anhang



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Versuchstierhaltung

Dr. rer. nat. Andreas Haemisch
Leitung

Medizinische Fakultät

Martinstraße 52
20246 Hamburg
Telefon: (040) 7410-54466
Telefax: (040) 7410-53079
haemisch@uke.uni-hamburg.de
www.uke.uni-hamburg.de

Teilnahmebescheinigung

Herr Christoph Matthias Hammers hat am 25.11.2009 an einem eintägigen Kurs über

Tierexperimentelles Arbeiten mit der Maus

teilgenommen. Der Kurs wurde veranstaltet von der Versuchstierhaltung des UKE unter Leitung von Dr. rer. nat. Haemisch und Dr. med. vet. Tiemann. Behandelt wurden folgende Themen:

- A. Tierschutzrechtliche Voraussetzungen für tierexperimentelles Arbeiten
- B. Biologie, Haltungsformen und Zuchtverfahren bei Labormäusen
- C. Handling und Applikationsmethoden (ip, sc, iv, po)
- D. Methoden der Blutentnahme (retro-bulbär, mandibulär)
- E. Narkoseverfahren (CO₂/O₂, Ketamin/Rompun)
- F. Tierschutzgerechtes Töten (Kohlendioxyd, cervikale Dislokation), Sektion
- G. Belastungsminderung bei Tieren im Versuch
- H. Organisation und Betrieb einer Versuchstierhaltung

Zu den Themen C-F wurden praktische Übungen durchgeführt. Die Hälfte der achtstündigen Kursdauer entfiel auf die praktischen Übungen.

Hamburg, den 25. November 2009

Dr. med. vet. B. Tiemann



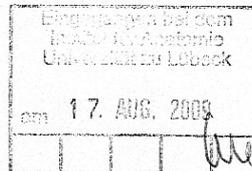
Versuchstierhaltung
zertifiziert nach DIN EN ISO 9001:2000
Zertifikat Nr. QS-6568 HH

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Körperschaft des öffentlichen Rechts
Gerichtsstand: Hamburg
USt-ID-Nr.: DE218518948

Vorstandsmitglieder:
Prof. Dr. Jörg F. Debatin (Vorsitzender)
Dr. Alexander Kirstein
Ricarda Klein
Prof. Dr. Dr. Uwe Koch-Gromus

Bankverbindung:
HSH Nordbank
Kto.-Nr.: 104 364 000
BLZ: 210 500 00
IBAN-Nr.: DE9721050000104364000

Ministerium für Landwirtschaft,
Umwelt und ländliche Räume
des Landes Schleswig-Holstein



Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |
Postfach 7151 | 24171 Kiel

Herrn
Prof. Dr. Jürgen Westermann
Institut für Anatomie
Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Ihr Antrag vom: 31.07.2009

Mein Zeichen: V 312-72241.122-1

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:
Herrn Dr. R. Noël
Gemeinsame Tierhaltung
der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

10. August 2009

Ausnahmegenehmigung für die Durchführung von Tierversuchen

Sehr geehrter Herr Prof. Westermann,

aufgrund Ihres o. a. Antrages erteile ich

Herrn Christoph Hammers

gemäß § 9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, ber. S. 1313), zuletzt geändert durch Gesetz vom 18. Dezember 2007 (BGBl. I S. 3001), die Ausnahmegenehmigung, unter Ihrer Aufsicht Eingriffe und Behandlungen an Mäusen durchzuführen.

Die Genehmigung erstreckt sich auf subkutane und intradermale Injektionen, Blutentnahmen aus der lateralen Schwanzvene, das Töten durch CO₂-Inhalation sowie die Blut- und Organentnahme nach Tötung.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Irmer

Dr. Irmer



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Gemeinsame Tierhaltung Leiter: Dr. med. vet. R. Noël

Gemeinsame Tierhaltung der Universität zu Lübeck, Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Frau
Dr. Katja Bieber
Institut für Anatomie
Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Aktenzeichen (bei Schriftwechsel bitte angeben)

Bearbeiter(in)

Telefon / Fax: 0451-5002876/4193

Datum

Giesfeldt

26.05.2008

Anzeige vom
Antrag vom 08.02.2008 mit Ergänzung vom 21.04.2008

Sehr geehrte Frau Dr. Bieber,

der genehmigte TV - Antrag:

"Untersuchungen zur Kinetik der Ausbildung von Autoimmunerkrankungen
am Beispiel der Epidermolysis Bullosa Acquisita (EBA)"

ist unter der Vers. Nr. 23/y /08 in der Gemeinsamen Tierhaltung registriert.
Es dürfen bis zu 444 Tiere bestellt werden.

Benutzen Sie bitte diese Vers.- Nr. bei den Tierbestellungen (Tel. 2876). Die Tierbestellungen
für die folgende Woche sind bis spätestens Freitag 11 Uhr an das Sekretariat (K. Giesfeldt)
durchzugeben. Bitte teilen Sie uns auch die Kostenstelle und den Fin. Schlüssel bei der Bestellung mit.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. R. Noël
Tierschutzbeauftragter
der Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät



Universität zu Lübeck

Urkunde

Die Medizinische Fakultät ehrt

**Herrn cand. med.
Christoph Hammers**

für die Bearbeitung seines Promotionsvorhabens

**„In-vivo-Charakterisierung von Autoimmunreaktionen im
murinen EBA-Modell“**

am

Institut für Anatomie

mit einem Promotionsstipendium im Rahmen der universitären
„Exzellenzmedizin“

Lübeck, den 18.07.2009



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'W. Solbach'.

Prof. Dr. med. Werner Solbach
Dekan

8 Danksagungen

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Jürgen Westermann möchte ich mich nicht nur für die Möglichkeit zur Bearbeitung dieses spannenden und vielseitigen Themas in seinem Institut, sondern auch für die wertvollen Gespräche, Anregungen und den tiefen Einblick in Wissenschaft und Forschung bedanken.

Frau Dr. rer. physiol. Katja Bieber danke ich für die Heranführung an das Thema, Frau Dr. rer. nat. Kathrin Kalies für Hilfe und Beratung bei fachlichen Fragen. Herrn Prof. Dr. med. Detlef Zillikens und Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ludwig sei für die Bereitstellung der rekombinanten Proteine und die fachkundige Beratung zu einzelnen Fragestellungen gedankt. Mein Dank gilt ebenfalls den Mitarbeitern des Instituts für Anatomie: Frau Lidija Gutjahr danke ich für die Hilfestellung bei den zahlreichen histologischen Präparaten, Frau Marie-Luise Leppin und Frau Karola von Lingelsheim sei für die guten Gespräche und die positive Arbeitsatmosphäre gedankt. Den Kollegen David Banczyk, Claudia Stamm, Julia Barthelmann und Christoph Ellebrecht danke ich für stets kompetente Unterstützung bei allgemeinen wie speziellen Fragen zur Methodik und die gemeinsam verbrachte Zeit im Institut.

Der Forschungsförderung der medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck danke ich für die großzügige Unterstützung meiner Arbeiten durch das gewährte Stipendium.

Dank gebührt auch meinen engen Freunden, die mich über die letzten Jahre begleitet haben.

Ich danke meinen Großmüttern, die bei jeder Prüfung und jedem Experiment mitgefiebert und immer an das Gelingen geglaubt haben.

Meinen lieben Eltern danke ich sehr für ihre kontinuierliche Unterstützung und den Zuspruch, nicht nur während des Studiums und der Zeit im Labor.

9 Lebenslauf



Persönliche Daten

Name, Vornamen	Hammers, Matthias <u>Christoph</u>
Geburtsdatum und -ort	26.04.1984, Flensburg
Familienstand	Ledig
E-Mail-Adresse	christoph.hammers@medizin.uni-luebeck.de

Ausbildung, Studium und Beruf

06/2004	Abitur an der Auguste-Viktoria-Schule, Flensburg
10/2004	Aufnahme des Medizinstudiums an der Universität zu Lübeck
08/2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2011– 05/2011	Zweite ärztliche Prüfung und Approbation
07/2011 – 09/2011	Assistenzarzt an der Schmerzklinik Kiel (Chefarzt: Prof. Dr. med. Hartmut Göbel)
09/2011– 09/2013	Research Scholar bei John R. Stanley, MD, am Department of Dermatology, University of Pennsylvania, School of Medicine, Philadelphia, PA, USA

Stipendien und Auszeichnungen

03/2004	Auszeichnung hervorragender Leistungen im Fach Physik durch die Deutsche Physikalische Gesellschaft e. V.
11/2004	Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes: Studienförderung bis 05/2011
03/2007	Verleihung des Zertifikats „Medizinische Ethik in der Ausbildung“ durch Prof. Dr. phil. Dietrich von Engelhardt (Institut für Medizin- und Wissenschaftsgeschichte, Universität zu Lübeck)

- | | |
|-------------------|---|
| 10/2008 – 09/2009 | Promotionsstipendium „Exzellenzmedizin“, verliehen durch die Forschungsförderung der medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck |
| 06/2009 | Posterpreis des dritten Lübecker Doktorandentags in der Universitätskirche St. Petri |
| 04/2010 – 07/2010 | Mitglied der Masterclass Innere Medizin der medizinischen Klinik I am UK-SH, Campus Lübeck (Leitung: Prof. Dr. med. H. Lehnert) |

Veröffentlichungen

- **Hammers CM**, Bieber K, Banczyk D, Kalies K, Ellebrecht CT, Ibrahim SM, Zillikens D, Westermann J, Ludwig RJ: *Complement-fixing anti-type VII collagen antibodies are induced in Th1-polarized lymph nodes of EBA-susceptible mice.* (akzeptiert, in Revision)
- **Hammers CM**, Boehm A, Lehnert H, Haas CS: *Consider the infrequent – an eleven years history of hypercalcemia with progressive renal insufficiency.* (in Vorbereitung)
- Kasperkiewicz M, Müller R, Manz R, Magens M, **Hammers CM**, Somlai C, Westermann J, Zillikens D, Ludwig RJ, Orosz A: *Heat shock protein 90 inhibition in autoimmunity to type VII collagen: evidence that non-malignant plasma cells are not therapeutic targets.* Blood 117, 6135-6142 (2011).
- **Hammers C**, Dunst J: *Radikalchirurgie oder adjuvante Radiotherapie bei retroperitonealen Sarkomen.* Strahlenther Onkol 8, 537-538 (2009).

Veröffentlichte Abstracts, Vorträge

- **Hammers CM**, Ludwig RJ, Zillikens D, Westermann J, Bieber K: *The role of cytokines and the major histocompatibility complex locus H2s in susceptibility to experimental epidermolysis bullosa acquisita.* Exp Dermatol 2, 179 (2010). (verbunden mit einem Vortrag auf der 37. ADF-Tagung in Lübeck, 2010)
- Bieber K, **Hammers C**, Ludwig RJ, Zillikens D, Westermann J: *Susceptibility to experimental epidermolysis bullosa acquisita (EBA) is correlated with the expression of Th1 cytokines.* Exp Dermatol 3, 289 (2009). (verbunden mit einem Vortrag auf der 36. ADF-Tagung in Heidelberg, 2009)