

Aus dem Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

In-vivo-Untersuchung zur Vorhersagbarkeit der
Epidermolysis bullosa acquisita im Tiermodell

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

- aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von Christoph Thomas Ellebrecht

aus Lübeck

Lübeck 2011

Erklärung

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Christoph Thomas Ellebrecht,

Lübeck, 2011

- | | |
|----------------------|-------------------------------------|
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. med. Jürgen Westermann |
| 2. Berichterstatter: | Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Frohn |
| 3. Berichterstatter: | Prof. Dr. med. M. Goebeler |

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16.07.2012

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Autoimmunität in der Haut	4
1.2	Die adaptive Immunantwort im Rahmen der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten	6
1.3	Fragestellung dieser Arbeit	12
2	Material & Methoden	14
2.1	Tiere und Tierhaltung	14
2.2	Versuchsablauf	14
2.3	Eingriffe	16
2.4	Färbungen	18
2.5	Quantifizierung der Gen-Expression mit der real-time RT PCR	22
2.6	Detektion von Typ-VII-Kollagen-spezifischen Antikörpern durch ELISA	26
2.7	Messung der Myeloperoxidase(MPO)-Aktivität in Hautproben	27
2.8	Grafiken und Statistik	27
3	Ergebnisse	29
3.1	Auswertung zum Auftreten und Ausbleiben von EBA-Symptomen	29
3.2	Auswertung des drainierenden Lymphknotens nach Krankheitsinduktion vor Symptomentstehung oder -ausbleiben	44
3.3	Auswertung von immunologischen Parametern im Blut und in der Haut vor Krankheitsinduktion	49
4	Diskussion	53
4.1	EBA-Symptome werden durch eine verstärkte Produktion und Bindung von Typ-VII-Kollagen-spezifischem IgG2c sowie einer neutrophilen Entzündung verursacht.	53
4.2	Die Entstehung von EBA-Symptomen ist nicht mit einer spezifischen Gewichtung der Th-Zell-abhängigen Immunantwort assoziiert.	55
4.3	Das Auftreten und der Schweregrad der EBA ist bereits vor Krankheitsinduktion vorhersagbar.	57
5	Zusammenfassung	61
6	Literaturverzeichnis	62
7	Anhang	73

1 Einleitung

1.1 Autoimmunität in der Haut

Autoimmunkrankheiten treten mit einer Prävalenz von 5% in Europa und Nordamerika auf, sind bislang nicht heilbar und zeigen einen oft chronisch progredienten Verlauf [38]. Sie entstehen durch eine Immunantwort gegen körpereigene Strukturen. Nahezu jedes Gewebe kann Ziel einer Autoimmunkrankheit sein. Besonders häufig treten Symptome in der Haut auf. Da die Haut aufgrund ihrer leichten Zugänglichkeit direkt visuell beurteilbar und diagnostisch gut erreichbar ist, dienen Autoimmundermatosen hervorragend als Modellerkrankungen für Autoimmunerkrankungen im allgemeinen [46]. Viele allgemeingültige immunologische Prinzipien wurden in der Haut und ihren Autoimmunkrankheiten entdeckt [46].

Die größte Gruppe unter den Haut-spezifischen Autoimmunkrankheiten bilden die blasenbildenden Autoimmundermatosen [117]. Diese sind potenziell lebensbedrohlich und stellen eine therapeutische Herausforderung dar. Sie zeichnen sich durch Blasenbildung in Haut und Schleimhäuten aus. Bei vielen blasenbildenden Autoimmunkrankheiten konnten Antikörper gegen Strukturproteine in der Epidermis oder ihrer Basalmembran identifiziert werden. Je nach Lokalisation dieser autoantigenen Strukturproteine können blasenbildende Autoimmundermatosen in zwei Gruppen eingeteilt werden [19]. Bei Krankheiten der Pemphigus-Gruppe (1) sind die Antikörper gegen desmosomale Strukturen gerichtet; es kommt zu einer suprabasalen bzw. subkornealen Spaltbildung in der Haut [121]. Werden Antikörper gegen hemidesmosomale Proteine gebildet (Gruppe 2) entstehen Blasen im Bereich der dermoepidermalen Junktionszone (DEJ), die Dermis von Epidermis trennt. Vertreter der letzteren Gruppe sind alle Formen des Pemphigoids sowie die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) [32].

Die EBA ist ein klinisch besonders schwer verlaufender Typ der zweiten Erkrankungsgruppe. Sie ist mit einer Inzidenz von $0,2/10^6$ pro Jahr [17, 69, 132] relativ selten. Das Ziel-Antigen der Antikörper ist die NC1-Domäne des Typ-VII-Kollagen [47, 75, 130]. Dieses verbindet in Form von Ankerfibrillen die Basalmembran der Epidermis mit der darunter liegenden Dermis. Typ-VII-Kollagen ist das ultrastrukturelle Korrelat für die mechanische Stabilität der DEJ. Die EBA lässt sich beim Menschen klinisch in drei Varianten einteilen [105, 131]. Der häufigste Typ ist die Bullöse Pemphigoid(BP)-Variante, die inflammatorisch verläuft und zur Fragilität sowie Entzündung der Haut mit narbiger Abheilung führt. Diagnostisch ist die EBA durch subepidermale Blasenbildung mit neutrophilem Infiltrat gekennzeichnet. Die Basalmembran befindet sich ultrastrukturell im Dach der gebildeten Blase. Die direkte Immunfluoreszenz zeigt lineare Ablagerungen von IgG und des Komplement-Proteins C3 [58]. Im Menschen sind in der indirekten Immunfluoreszenz in 20-50% der Fälle Anti-Typ-VII-Kollagen-Antikörper nachweisbar [120]. Therapeutisch ist die EBA schwer zu beherrschen und verläuft meistens chronisch progredient. Neben klassischen Immunsuppressiva wie Glucocorticoiden, Azathioprin, Mycophenol und Cyclophosphamid ist eine Therapie mit i.v.-Immunglobulinen (IVIg), Immunadsorption und Rituximab möglich [50, 67].

Die EBA eignet sich hervorragend als Modellerkrankung für Autoimmunkrankheiten, da erstens das auslösende Antigen bekannt und sie zweitens als Autoimmunkrankheit der Haut makroskopisch sichtbar ist. Zum besseren Verständnis dieser Autoimmunkrankheit wurde ein Maus-Modell entwickelt, bei dem pathogene Antikörper injiziert werden [119]. Desweiteren konnte ein aktiv Krankheits-induzierendes Maus-Modell etabliert werden, bei dem die EBA durch Injektion eines Fragments der NC1-Domäne von Typ-VII-Kollagen gemeinsam mit dem Adjuvans Titermax ausgelöst wird [116]. In beiden Modellen kommt es bei den Mäusen zu EBA-typischen Symptomen. Es kann eine Ablagerung von Anti-Typ-VII-Kollagen-Antikörpern und des Komplement-Proteins C3 an der DEJ sowie eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten in der Dermis nachgewiesen werden. Der SJL-Maus-Stamm ist in hohem Maß suszeptibel für die zuletzt genannte aktive Krankheitsinduktion. T-Zellen sind essentiell für die Entstehung der EBA im aktiv induzierenden Modell [115]. Für dieses Modell ist hervorzuheben, dass permanent 80% der injizierten Mäuse erkranken, während 20% gesund bleiben [116]. Dieser konstante Unterschied in der Krankheitsentstehung ist eine Besonderheit dieses Maus-Modells. Es ist bislang unklar, welche Abläufe während der Immunantwort zwischen kranken und gesunden Mäusen unterschiedlich sind. Gelingt es, Unterschiede zwischen erkrankenden und trotz Krankheitsinduktion gesund bleibenden Mäusen in der Immunantwort zu definieren, würden sich hieraus neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen.

Zur Identifikation dieser Unterschiede muss die Immunantwort in ihren unterschiedlichen Stadien untersucht werden. Hierbei sind besonders die Stadien vor dem Auftreten von Symptomen und sogar vor der Krankheitsinduktion interessant. Trotz gleicher genetischer Ausstattung und identischen Umweltbedingungen müssen 80% der SJL-Mäuse vor Krankheitsinduktion und vor Symptomentstehung immunologische Unterschiede zu gesund bleibenden Mäusen aufweisen. Diese Unterschiede können sowohl durch qualitative und quantitative Veränderungen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems bedingt sein und führen trotz intrinsischer (genetischer) und extrinsischer (Umweltbedingungen) Gleichheit zu einem unterschiedlichen klinischen Phänotyp. Im Stadium vor der Krankheitsinduktion muss dem angeborenen Immunsystem besondere Beachtung geschenkt werden. Es wehrt die überwiegende Mehrheit der Pathogene ab, ohne dass es zu klinischen Symptomen kommt [61]. Schwankungen in diesem System vor der Krankheitsinduktion können möglicherweise trotz klinischer Gesundheit die Wirkung der Injektion beeinflussen und deren Ergebnis vorher-sagen. Da das angeborene Immunsystem innerhalb weniger Minuten bis Stunden seinen Aktivierungszustand ändern kann [93], sind Unterschiede vor der Krankheitsinduktion bei sonstiger Gleichheit der Tiere wahrscheinlich. Ob physiologische Schwankungen in der angeborenen Abwehr mit dem Ergebnis einer Krankheitsinduktion zusammenhängen, wurde bislang in keinem Tiermodell untersucht. Im Stadium nach der Krankheitsinduktion, jedoch vor der Symptomentstehung steht das adaptive Immunsystem im Fokus meiner Untersuchungen. Unterschiede in der Generierung der adaptiven Immunantwort verursachen Unterschiede der immunologischen Effektormechanismen. Dies kann ebenfalls die unterschiedliche Anfälligkeit

der genetisch identischen Mäuse bei gleichen Umweltbedingungen erklären und vorhersagen. Aus dem Genannten erschließt sich das grundlegende Ziel der vorliegenden Arbeit, die einen Beitrag zum besseren Verständnis der unterschiedlichen Empfänglichkeit genetisch identischer Mäuse bei gleichen Umweltbedingungen für die Induktion der experimentellen EBA leisten soll.

Da es sich in diesem Modell um eine T-Helfer(Th)-Zell abhängige Immunantwort handelt, erläutere ich im Folgenden die adaptive, von T-Helfer-Zellen gesteuerte Immunantwort mit Hinblick auf das Phänomen Autoimmunität, um die theoretische Grundlage für die Fragestellung dieser Arbeit zu legen.

1.2 Die adaptive Immunantwort im Rahmen der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten

Die adaptive Immunantwort besitzt in der Entstehung von Autoimmunkrankheiten eine zentrale Rolle. Es ist keine Autoimmunkrankheit bekannt, die ohne Beteiligung des adaptiven Immunsystems einhergeht [66]. Die maßgeblich an der Entstehung von Autoimmunkrankheiten beteiligten Zellen des adaptiven Immunsystems sind autoreaktive T-Zellen [38, 66, 117]. Die adaptive Immunantwort hängt jedoch auch von einer Aktivierung durch das angeborene Immunsystem ab. Im folgenden wird deshalb der Verlauf der adaptiven Immunantwort ausgehend von der Aktivierung durch das angeborene Immunsystem mit Betonung des Phänomens "Autoimmunität" erläutert. Hierbei werden naive autoreaktive T-Zellen von dendritischen Zellen aktiviert; dies geschieht vorwiegend in sekundär lymphatischen Organen. Die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen verläuft in verschiedenen Schritten und bringt unterschiedliche T-Effektor-Zellen hervor. Diese können ihrerseits B-Zellen aktivieren, welche Antikörper produzieren und so eine Entzündung im Bereich des Autoantigens auslösen.

Autoreaktive, naive T-Zellen können trotz Selektion im Thymus entstehen.

Die Eliminierung der meisten autoreaktiven T-Zellen geschieht im Thymus. Hierhin wandern die ursprünglich im Knochenmark gebildeten T-Zellen aus [133]. Im Thymus erfolgt die Differenzierung in T-Helfer-Zellen (CD4+) und zytotoxische T-Zellen (CD8+). Desweiteren werden einerseits T-Zellen selektiert, die MHC-Moleküle erkennen (MHC-Restriktion, positive Selektion). Andererseits sterben T-Zellen, die eine zu starke Reaktion auf präsentierte Autoantigene zeigen (negative Selektion) [6, 7]. Diese Selektionsmechanismen führen zur Eliminierung fast aller autoreaktiver T-Zellen und sind entscheidend an der Ausbildung der Toleranz des Immunsystems beteiligt. Dennoch entstehen wenige autoreaktive T-Zellen, die durch dendritische Zellen aktiviert werden können [68].

Dendritische Zellen spielen eine wichtige Rolle für die Aktivierung der T-Zell-abhängigen Immunantwort.

Dendritische Zellen (DCs) gehen aus Monozyten hervor und weisen abhängig von ihrer Lokalisation im Körper spezifische Differenzierungen auf (Langerhans-Zellen in der Haut, Alveolarmakrophagen) [25]. Sie sind durch eine starke Expression von CD11c charakterisiert. Dendritische Zellen und Makrophagen dienen der lokalen Abwehr auf den Oberflächen des Körpers. Die Mehrzahl der Pathogene wird vor Ort eliminiert. Übersteigt die Antigen-Menge die Kapazität des angeborenen Immunsystems, wandern DCs nach Phagozytose oder Makropinozytose des Antigens in den drainierenden Lymphknoten [3]. Die Wanderung der DCs wird durch die Bindung der Antigene an PAMP-Rezeptoren wie TLRs mit nachfolgender Signaltransduktion ausgelöst [20, 61]. Hierdurch wird der Chemokin-Rezeptor CCR7 vermehrt exprimiert. Sein Ligand CCL21 wird von sekundär lymphatischem Gewebe produziert [10]. Die Fähigkeit zur Phagozytose geht bei der Migration verloren. Die Präsentation des Antigens über MHC II (in seltenen Fällen auch über MHC I) hingegen findet verstärkt statt. Die Zellen treten über die afferenten Lymphgefäße in die Randsinus des drainierenden Lymphknotens (siehe nächsten Abschnitt) und von dort in die T-Zell-Zone des Lymphknotens (Paracortex) ein. Nach ihrem Eintritt in die T-Zell-Zone sind die DCs in Lage, T-Zellen zu aktivieren [59]. Diese sind spezifisch gegen dasselbe Antigen gerichtet, das die DCs aktiviert hat. Neben der Präsentation des Antigens werden die T-Zellen durch co-stimulatorische Moleküle wie B7.1 und B7.2 aktiviert [22]. Fehlen co-stimulatorische Signale (wie bei der Präsentation körpereigener Peptide), so erfolgt eine Hemmung der T-Zellen. Dies verhindert die Entstehung von Autoimmunkrankheiten.

Die Aktivierung naiver T-Zellen erfolgt in sekundär lymphatischen Organen.

Die Generierung der pathogenen Immunantwort bei Autoimmunkrankheiten erfolgt in den sekundär lymphatischen Organen [64]. Hierzu werden Lymphknoten, Mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe und die Milz gezählt. Diese Organe zeigen in ihrem Aufbau eine ausgeprägte räumliche Ordnung. Aufgrund von verschiedenen Zellpopulationen mit unterschiedlicher Funktion lässt sich diese Ordnung durch verschiedene Kompartimente beschreiben (siehe Fig 1.1). Im folgenden sollen der kompartimentelle Aufbau des Lymphknotens sowie dessen funktionelle Relevanz für die Th-Zell-vermittelte Immunantwort im Fokus stehen.

Lymphknoten sind im allgemeinen nierenförmig aufgebaute Organe, die von einer Kapsel umgeben werden. Die Maus besitzt 22 identifizierbare Lymphknoten-Stationen [39, 129]. Sie weisen auf ihrer konkaven Seite einen Hilus auf, an dem Blutgefäße in den Lymphknoten eintreten oder ihn verlassen. An dieser Stelle treten auch die efferenten Lymphgefäße aus dem Lymphknoten aus [107]. An der konvexen Seite durchbrechen afferente Lymphgefäße die Kapsel und münden in den subkapsulären Randsinus. Der Aufbau von Lymphknoten lässt sich durch drei große Kompartimente darstellen. Die peripher gelegene Rinde (Cortex)

wird vom Mark (Medulla) des Lymphknotens unterschieden. Diese beiden Kompartimente werden durch eine Zwischenschicht, den Paracortex, getrennt, der das dritte Kompartiment bildet [51]. Die Beschreibung der Kompartimente erfolgt entsprechend dem Ablauf der T-Helfer-Zell-abhängigen Immunantwort. Antigene werden über die afferenten Lymphbahnen in löslicher Form sowie als Peptidfragmente auf der Zelloberfläche dendritischer Zellen in den Lymphknoten transportiert. Die dendritischen Zellen wandern über den subkapsulären Randsinus in die radiären Lymphsinus ein. Diese durchziehen den Cortex. Im Bereich des Paracortex wandern die DCs aus den Lymphgefäßen aus, differenzieren zu interdigitierenden dendritischen Zellen (IDCs) und treffen auf den dominanten Zelltyp dieses Kompartiments, die T-Zellen [106]. Die paracortikale T-Zell-Zone ist der Ort, an dem im Blut zirkulierende T-Zellen über die hochendothelialen Venulen (HEV) die Blutbahn verlassen [23, 83]. Ihre Migration im Bereich der HEV erfolgt mithilfe von Adhäsionsmolekülen wie L-Selektin, LFA-1 und VLA-4, die an entsprechende Liganden auf dem Endothel der HEVs (ICAM1-3) binden. T-Zellen exprimieren den Chemokin-Rezeptor CCR7. Die Bindung von Chemokinen (CCL21, CCL19 und CCL18) an diese Rezeptoren steuert die Wanderung der T-Zellen in die T-Zell-Zone [53]. Die Chemokine werden von lymphatischen Stroma-Zellen sowie von dendritischen Zellen generiert. Durch verminderte Expression von Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren wird die Auswanderung von aktivierten T-Zellen aus dem Lymphknoten gehemmt [113]. Die T-Zell-Zone besitzt eine essentielle Rolle in der Generierung einer adaptiven Immunantwort; hier treffen naive (nicht aktivierte) T-Zellen erstmals auf ihr spezifisches Antigen und lösen durch ihre Reaktion die adaptive Immunantwort gegen dieses Antigen aus [48, 49]. Der Cortex wird aufgrund des hier vorherrschenden Zelltyps als B-Zell-Zone bezeichnet. An der Grenze zwischen Paracortex und Cortex treffen aktivierte T-Zellen auf naive B-Zellen. Diese werden von T-Zellen aktiviert und bilden innerhalb der B-Zone Keimzentren. In diesen Keimzentren reifen die naiven B-Zellen zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen heran. Die Keimzentren bestehen aus einer dunklen Zone, in der die reifenden B-Zellen (Zentroblasten) proliferieren, und einer hellen Zone, in der die reifenden B-Zellen selektiert werden [54]. Innerhalb des Keimzentrums gibt es follikulär dendritische Zellen, die das Antigen, gegen das die B-Zellen gerichtet sind, ständig präsentieren [82, 129]. Desweiteren werden die B-Zellen durch Th-Zellen in ihrer Keimzentrumsreifung unterstützt. Gedächtnis-B-Zellen und reife Plasmazellen können in der Medulla des Lymphknotens nachgewiesen werden, ebenso wie andere Lymphozyten-Populationen, die über die Marksinus in die efferenten Lymphbahnen aus dem Lymphknoten auswandern [107, 129].

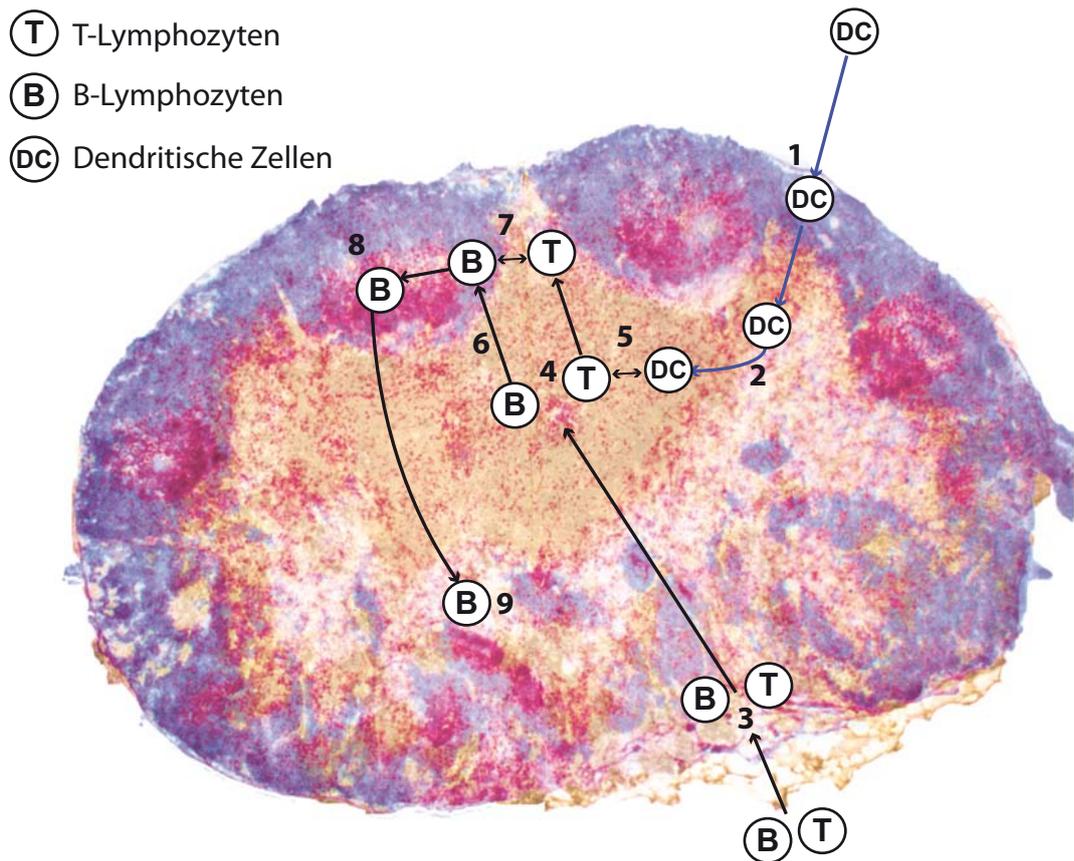


Fig. 1.1: **Kompartimente des murinen Lymphknotens.** Mikroskopische Darstellung mittels immunohistochemischer Färbung. In der Peripherie liegt die B-Zell-Zone (Cortex, B220⁺, blau). Weiter zentral liegt die T-Zell-Zone (Paracortex, TCR β ⁺, braun). Dazwischen sind die Keimzentren in den Sekundärfofollikeln lokalisiert (Ki-67⁺, magenta). Dendritische Zellen wandern über die afferenten Lymphbahnen in den Marginalsinus ein (1). Von dort gelangen sie über radiäre Lymphsinus in den Paracortex. Hier verlassen sie die Lymphsinus und wandern in die T-Zell-Zone aus (2). T- und B- Lymphozyten gelangen über Blutgefäße in den Lymphknoten (3); sie verlassen die Blutbahn im Bereich der hochendothelialen Venulen (4). T-Zellen treffen im Paracortex auf dendritische Zellen, die ihr spezifisches Antigen präsentieren, und werden aktiviert (5). B-Zellen wandern durch die T-Zell-Zone zum Cortex (6). An der Grenze zwischen Paracortex und Cortex treffen aktivierte T-Zellen auf B-Zellen und aktivieren diese (7). B-Zellen bilden ein Keimzentrum und proliferieren zu Plasmazellen und Gedächtniszellen (8). Sie wandern in die Medulla (ungefärbt) und produzieren Antikörper (9). 10fache Vergrößerung. 3fach Färbung durch graphische Projektion aus einer Doppel- und einer Einfach-Färbung. Referenzen im Abschnitt 1.2.

T-Zellen werden in verschiedenen Schritten aktiviert.

Durch Interaktion von dendritischen Zellen und T-Zellen werden die letzteren aktiviert. Dies geschieht in der T-Zell-Zone der sekundär lymphatischen Organe. Die Aktivierung erfolgt gemäß JANEWAY in drei Schritten und führt zur Proliferation antigenspezifischer T-Zell-Klone [94]. Zunächst erkennt die T-Zelle mithilfe des T-Zell-Rezeptors und seines Co-Rezeptors (CD4 oder CD8) den Antigen-MHC-II-Komplex auf der dendritischen Zelle

(Schritt 1) [22]. Dies führt zur Aktivierung der T-Zelle. Außerdem müssen co-stimulatorische Moleküle auf der dendritischen Zelle (B7.1, B7.2, ICOS, CD27, CD40) vorhanden sein (Schritt 2) [127]. Kommt es aufgrund von Aktivierung des angeborenen Immunsystems zur gleichzeitigen Präsentation von co-stimulatorischen Signalen und körpereigenen Peptiden, können autoreaktive T-Zellen aktiviert werden und Autoimmunkrankheiten entstehen. Die Aktivierung von T-Zellen führt zu deren Differenzierung und zur Bildung von T-Effektorzellen (Schritt 3).

T-Helfer Zellen entstehen unter dem Einfluss verschiedener Zytokine.

CD4⁺ T-Zellen differenzieren in verschiedene T-Helferzell-Subtypen [1, 60]. Dies verläuft unter dem Einfluss des lokalen Zytokin-Milieus, das vorrangig von der Antigen-präsentierenden Zelle (APC, meistens dendritische Zellen) generiert wird [5, 90]. Es können Th1-, Th2-, Th17- sowie regulatorische T-Zellen unterschieden werden. Produziert die dendritische Zelle vorwiegend Interleukin (IL) 12 und IFN γ , so entwickelt sich eine Th1-Zelle [55]. Die Bindung von IL12 und IFN γ führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors T-bet, der charakteristisch für Th1-Zellen ist. T-bet bewirkt die Expression der Th1-charakteristischen Zytokine IFN γ und IL12. Diese verhelfen Makrophagen zur effektiven Bekämpfung phagozytierter Pathogene. Zudem bewirken Th1-Zellen bei B-Zellen im Keimzentrum einen Klassenwechsel der konstanten Region der Antikörper.

Th2-Zellen entstehen unter dem Einfluss von IL4, das in den T-Zellen den Transkriptionsfaktor GATA3 aktiviert. Th2-Zellen exprimieren neben IL4 auch IL5 und IL13. Diese verursachen einen Klassenwechsel zu IgE, was bei allergischen Reaktionen sowie der Abwehr parasitärer Pathogene von entscheidender Bedeutung ist. Zwischen Th1- und Th2-Zellen findet eine reziproke Hemmung statt [31]. Akute Immunantworten werden von Th1- sowie Th2-Zellen gleichzeitig durchgeführt; chronische Immunantworten, wie sie bei Autoimmunkrankheiten auftreten, sind hingegen Th1- oder Th2-polarisiert [94].

In neuerer Zeit wurden Th17-Zellen als eine weitere Population von Th-Effektor-Zellen entdeckt [73, 89]. Sie entstehen zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Aktivierung der Th-Zellen unter dem Einfluss von IL6 und TGF β . Th17-Zellen produzieren vornehmlich IL17 sowie IL6 und IL23. Der spezifische Transkriptionsfaktor ist ROR γ t. Unter dem Einfluss von Th17-Zellen kommt es zu einer verstärkten inflammatorischen Antwort durch neutrophile Granulozyten. Th17-Immunantworten werden für die Entstehung von Autoimmunkrankheiten vornehmlich verantwortlich gemacht.

Die Proliferation autoreaktiver T-Zellen und die Entwicklung zu Effektorzellen kann durch regulatorische T-Zellen gehemmt werden. Im Thymus werden natürliche, regulatorische CD4⁺ T-Zellen (nTreg) gebildet. Diese werden durch eine starke Bindung von Autoantigenen an MHC-Molekülen selektiert, zeichnen sich durch den Transkriptionsfaktor FoxP3 aus und produzieren vornehmlich die Zytokine TGF β und IL10 [44, 45, 76]. Außerdem entstehen während der adaptiven Immunantwort regulatorische T-Zellen, die funktionell und morpho-

logisch vielgestaltig sind. Sie produzieren zumeist IL10 sowie TGF β und hemmen ebenfalls die T-Zell-Proliferation. Treg- und Th17-Zellen stehen in einem reziprok hemmenden Verhältnis [76], so dass Treg-Zellen ein protektiver Einfluss auf Autoimmunkrankheiten zuzuschreiben ist.

T-Helfer-Zellen aktivieren und beeinflussen B-Zellen.

Unter physiologischen Bedingungen sind autoreaktive B-Zellen in jedem Organismus nachzuweisen. Ihre Toleranz gegenüber dem Selbst beruht vermutlich auf einer mangelnden Aktivierung durch Th-Zellen [66]. B-Zellen werden durch die oben beschriebenen Th-Effektor-Zellen durch Zytokine und Zell-Zell-Kontakt beeinflusst [84]. Hat eine B-Zelle ein Antigen mittels membranständigem Immunglobulin gebunden und internalisiert, werden Fragmente über MHC II präsentiert. Treffen aktivierte B- und T-Zelle an der Grenze von T- zur B-Zell-Zone eines Lymphknotens aufeinander, so wird die B-Zelle durch die Th-Zelle stimuliert (CD40L, LFA-1, Zytokine) und wandert unter dem Einfluss von CXCL13 in einen Primärfollikel ein [100]. Es bildet sich ein Keimzentrum [34]. Hier findet unter dem Einfluss von Th-Zellen und follikulär dendritischer Zellen eine Affinitätsreifung sowie ein Klassenwechsel der Antikörper von IgD und IgM zu anderen Klassen statt [80]. B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen, die wenige membranständige Antikörper präsentieren, kein MHC II auf ihrer Oberfläche tragen, jedoch intensiv Antikörper produzieren. Der Klassenwechsel sowie die Affinitätsreifung der Antikörper sind irreversibel. Das Enzym Activation Induced Cytidin Deaminase (AID) in B-Zellen ist essentiell für die somatische Hypermutation und den Klassenwechsel [126]. Aus der Keimzentrumsreaktion resultieren Plasmazellen und B-Gedächtnis-Zellen [101].

Antikörper gegen dasselbe Antigen können unterschiedliche Effektor-Funktionen aufweisen.

Beim Klassenwechsel (engl. class switch) entstehen Antikörper, die gegen dasselbe Antigen gerichtet sind. Ihre Effektorfunktion unterscheidet sich jedoch abhängig von der konstanten Region des Antikörper-Moleküls [29]. Aktivierte B-Zellen produzieren ohne Einfluss von Th-Zellen IgM-Antikörper. Diese bilden Pentamere, besitzen eine geringe Affinität zum Antigen und aktivieren effizient das Komplement-System. Durch den Klassenwechsel werden IgA, IgE und IgG gebildet. IgA-Antikörper werden vornehmlich durch die Mucosa in das Lumen der jeweiligen Organe transportiert. Die Vernetzung von IgE-Rezeptoren führt zur Degranulation von Mastzellen.

Die Antikörper der Klasse IgG können wie die anderen Klassen in weitere Subklassen unterteilt werden [13]. Bei der Maus werden IgG1-Antikörper vornehmlich unter dem Einfluss von Th2-Zytokinen gebildet. Th1-Zytokine hingegen führen zur Produktion von IgG2a/c-, IgG2b- und IgG3-Antikörpern. Die Antikörper-Subklassen IgG2a/c und IgG2b binden mit hoher Affinität an die Fc γ -Rezeptoren III und IV und führen zur Aktivierung von Effektorzellen sowie zur Aktivierung von Komplement [36]. Diese Antikörper-Subklassen sind als

proinflammatorisch einzustufen. IgG1 hingegen besitzt eine geringe Aktivität zu $Fc\gamma RIII$ und IV , jedoch eine höhere zum inhibitorisch wirkenden $FC\gamma RIIB$ [98]. IgG1 ist im Rahmen einer Th2-abhängigen, chronischen Immunantwort weniger geeignet, eine Entzündung zu unterhalten. Dies geht einher mit der Beobachtung, dass in den meisten autoimmunen Tier-Modellen eine Th1- bzw. eine Th17-Antwort für die Krankheitsentstehung verantwortlich ist.

Die Bindung von Antikörpern an ihre Zielstruktur führt somit neben der Neutralisierung dieser Struktur zur Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems. Dies geschieht durch das Komplement-System, das chemotaktisch auf Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten wirkt. Desweiteren kann eine direkte Degranulation von neutrophilen Granulozyten durch Bindung der Antikörper an $Fc\gamma$ -Rezeptoren erfolgen. Diese Degranulation ist Teil einer starken inflammatorischen Reaktion, die zur Eliminierung eines Autoantigens beiträgt. Die durch neutrophile Granulozyten bedingte Entzündung führt zur Expression von Chemokinen im Umgebungsgewebe. Diese Chemokine besitzen sowohl inflammatorisch perpetuierenden als auch inhibierenden Charakter. Eine zusätzliche Infiltration von neutrophilen Granulozyten wird durch KC (Keratinocyte-derived Chemokine, Maus-Homolog zum humanen IL8) und IL33 erreicht [4, 72, 124, 125].

Zusammenfassend ist die adaptive Immunantwort durch ein Wechselspiel von angeborenem und adaptivem Immunsystem gekennzeichnet. Das angeborene Immunsystem signalisiert den T-Zellen durch Peptid-Präsentation, dass eine Konfrontation mit einem Antigen vorliegt. Handelt es sich hierbei um ein körpereigenes Peptid, so können autoreaktive Th-Zellen aktiviert werden. Diese reagieren durch Proliferation und Differenzierung. Sie bekämpfen direkt das Antigen (zytotoxische T-Zellen) oder beeinflussen B-Zellen (Th-Zellen). Die gesteigerte Produktion von Antikörpern und proinflammatorischen Zytokinen wiederum fördert die Wirksamkeit des angeborenen Immunsystems und löst somit eine autoimmunogene Entzündung aus.

1.3 Fragestellung dieser Arbeit

Ich habe in dieser Arbeit die immunpathogenetischen Unterschiede zwischen Tieren, die nach Injektion von Typ-VII-Kollagen und Titermax erkranken, und solchen, die gesund bleiben, vor und nach der Krankheitsinduktion untersucht. Es handelt sich um genetisch identische Tiere, die unter gleichen Umweltbedingungen gehalten werden. Trotz der gleichen Bedingungen zeigen die Tiere nach der Krankheitsinduktion einen unterschiedlichen klinischen Verlauf. Durch den experimentellen Aufbau lassen sich die verschiedenen Stadien der Entwicklung autoimmunogener Symptome von einem Status völliger Gesundheit (vor der Krankheitsinduktion) über das Stadium der Autoimmunität (nach der Krankheitsinduktion, wenn noch keine Symptome vorhanden sind) bis zur Entstehung oder dem Ausbleiben von Krankheitssymptomen vergleichen.

Mit der Identifikation von pathogenetischen Unterschieden trotz gleicher Genetik und gleichen Umweltbedingungen ergeben sich potenzielle therapeutische Ziele, deren Beeinflussung

die Entstehung von Autoimmunkrankheiten verhindern kann. Vor der Krankheitsinduktion können Schwankungen in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems den Verlauf nach der Induktion beeinflussen und helfen, diesen Verlauf vorherzusagen. Ebenso sind Unterschiede in der initialen adaptiven Immunantwort nach der Induktion potenziell verantwortlich und prädiktiv für die unterschiedliche Empfänglichkeit der Krankheit trotz größtmöglicher Gleichheit der Tiere. Die Untersuchung der Parameter erfolgt *in vivo*. Hierbei wird die Immunantwort in ihrer zeitlichen und räumlichen Verteilung am lebenden Organismus charakterisiert. Folgende drei Fragestellungen sollen in der vorliegenden Arbeit untersucht werden:

1. *Welche Effektormechanismen der Immunantwort gegen Typ-VII-Kollagen sind für die Symptomentstehung verantwortlich?* Lymphknoten, Blutproben und Hautbiopsien werden nach Symptomentstehung oder -ausbleiben bei kranken und gesunden Tieren molekularbiologisch und histologisch verglichen.
2. *Lassen sich Unterschiede während der Immunantwort identifizieren, die vor Symptomentausbruch vorhersagen, ob ein Tier krank wird oder gesund bleibt?* *In-vivo*-Biopsien des drainierenden Lymphknotens werden vor Symptomentstehung entnommen, analysiert und mit der Krankheitsentwicklung korreliert.
3. *Lässt sich schon vor der Krankheitsinduktion anhand immunologischer Unterschiede vorhersagen, ob ein Tier krank wird?* Hierzu werden Hautproben und Blutproben vor Krankheitsinduktion entnommen und nach Krankheitsausbruch oder -ausbleiben auf die Expression von Oberflächenmarkern, Zytokinen und Chemokinen untersucht. Die erhobenen Parameter werden mit dem klinischen Score in Korrelation gesetzt.

2 Material & Methoden

2.1 Tiere und Tierhaltung

Für alle durchgeführten Versuche werden weibliche Tiere des SJL/J-Stammes verwendet. Diese werden entweder bei Charles River GmbH (Sulzfeld, Deutschland) oder Janvier SAS (Le Genest Saint Isle, Frankreich) im Alter von 6-8 Wochen kommerziell erworben. Nach einer Rekonvaleszenz (aufgrund des Transports) von 1-2 Wochen erfolgt die Krankheitsinduktion. Die Mäuse werden unter SPF (=spezifisch Pathogen-frei) Bedingungen in der zentralen Tierhaltung der Universität zu Lübeck gehalten. Die Gruppengröße beträgt 9 Tiere je Käfig. Die Mäuse sind durch Ohrlochmarkierungen eindeutig zu identifizieren. Die Käfigschale der Standardkäfige (42,5 cm x 26,6 cm x 15,5 cm) besteht aus Polycarbonat; die Abdeckung aus Edelstahlgittern mit einem Gitterabstand von 0,7 cm. Die Auslegung des Käfigbodens erfolgt mit Holzspänen (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und wird wöchentlich gewechselt. Trockenfutter (altromin1430, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und Wasser ist den Tieren ständig zugänglich. Die Umgebungstemperatur beträgt 23 ± 1 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 60 ± 5 %. Ein regelmäßiger Hell-Dunkel-Rhythmus wird durch eine Zeitschaltautomatik gewährleistet. Hell- und Dunkel-Phasen dauern jeweils 12 Stunden pro Tag. Hell-Phasen umfassen das Intervall von 6 bis 18 Uhr. Eine Genehmigung zur Durchführung der Tierversuche ist gegeben (Tierversuchsantrag 23/y/08 vom 16.05.2008, Kopie siehe Anhang). Der Autor besitzt ein Zertifikat über die Teilnahme am Kurs "Tierexperimentelles Arbeiten mit der Maus" (Dr.rer.nat. A. Haemisch, Versuchstierhaltung, Medizinische Fakultät, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Kopie siehe Anhang).

2.2 Versuchsablauf

In allen Versuchen wird weiblichen SJL-Mäusen im Alter von 8-10 Wochen die krankheitsinduzierende Injektion verabreicht. Die Krankheitsinduktion erfolgt durch subcutane Injektion von jeweils $25 \mu\text{l}$ in beide Fußsohlen. Injiziert wird eine Suspension aus einem rekombinanten Fragment des Typ-VII-Kollagen (mCol7C-GST (hergestellt nach [119])) in Titermax (Cyt Rx Corporation, Norcross, USA) im Volumenverhältnis 1:1. Die Suspension wird unter sterilen Bedingungen bei 4°C angesetzt. Die Opferung der Tiere erfolgt nach 9-10 Wochen.

In einem Screening-Ansatz werden zunächst ausgewählte kranke und gesunde (je $n=10$) Tiere miteinander verglichen. Diese Tiere stammen aus vier verschiedenen Versuchen; es werden die gesunden mit sehr schwer erkrankten Tieren verglichen. Anschließend erfolgt der Hauptversuch mit prädiktiver Fragestellung (siehe Fig. 2.1).

In diesem Hauptversuch werden weiblichen SJL-Mäusen ($n=34$) im Alter von 7-9 Wochen Hautbiopsien im Bereich der Ohren entnommen. Zum gleichen Zeitpunkt erfolgt die Entnahme von ca. $100 \mu\text{l}$ Blut aus einer Schwanzvene. Im Alter von 8-10 Wochen (5-6 Tage nach der Biopsie) findet die Krankheitsinduktion statt. Es wird eine wöchentliche Erhebung des

Krankheitsstatus durchgeführt. Hierbei werden alle Körperpartien nach Hautläsionen abgesehen, und die betroffene Fläche in Prozentangabe der jeweiligen Lokalisation angegeben. Im Anschluss erfolgt (auf Normanteilen der Körperpartien basierend) die Berechnung der gesamten betroffenen Körperoberfläche (KOF). Dies wird im Folgenden als Krankheitscore bezeichnet. Handelt es sich um fragliche EBA-Wunden, wird die betroffene Fläche mit einem Unsicherheitsfaktor (0,2) abgewertet. Als gesund werden Tiere betrachtet, die weniger als 1,5 % betroffene Körperoberfläche aufweisen, da dieser geringe Befall nicht von Artefakten unterschieden werden kann.

15 Tage nach Krankheitsinduktion findet die *in-vivo*-Biopsie des linken poplitealen Lymphknotens statt (n=28). Nicht operierte Tiere (n=6) dienen als Kontrollgruppe. Weitere Blutentnahmen finden zu den Zeitpunkten 4 und 6 Wochen sowie 10 Wochen nach der Krankheitsinduktion statt. Die Opferung der Tiere erfolgt 10 Wochen nach der Krankheitsinduktion. Verglichen werden wiederum gesunde mit schwer erkrankten Tieren.

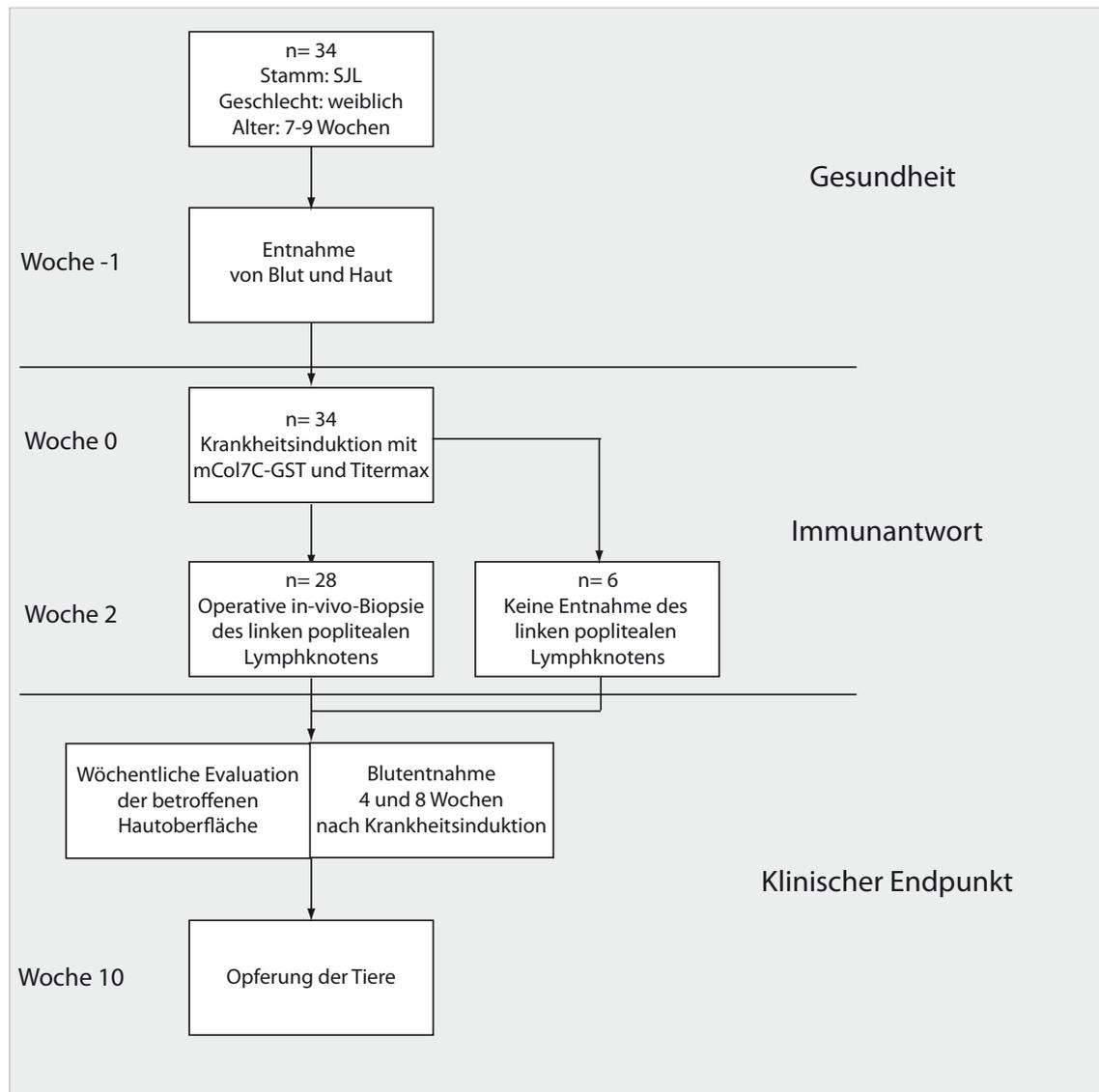


Fig. 2.1: **Versuchsablauf:** Dargestellt ist der Versuchsablauf des prädiktiven Versuches. Es werden eine Woche vor der Krankheitsinduktion Haut- und Blutproben entnommen. Im Alter von 8-10 Wochen erfolgt die Krankheitsinduktion. 2 Wochen nach Krankheitsinduktion wird der Versuchsgruppe ein Lymphknoten entnommen. Der Kontrollgruppe wird kein Lymphknoten entnommen. Im folgenden Zeitraum werden die Tiere klinisch wöchentlich evaluiert; es erfolgen zwei weitere Blutentnahmen. Die Opferung erfolgt 10 Wochen nach der Krankheitsinduktion. Rechts werden die drei untersuchten Stadien des Experimentes bezeichnet. Die Probenentnahme vor Krankheitsinduktion stellt den gesunden Zustand dar; im Lymphknoten nach 2 Wochen wird die potenziell pathogene Immunantwort charakterisiert; der klinische Endpunkt wird durch die klinische Evaluation und die folgende Probenentnahme beschrieben.

2.3 Eingriffe

Sämtliche Eingriffe an den Versuchstieren erfolgen in Kurznarkose durch intraperitoneale Injektion einer Mischung aus Ketaminhydrochlorid (12 mg/ml) und Xylazinhydrochlorid (1,6 mg/ml) in steriler 0,9% NaCl-Lösung in der Dosierung 10 ml/kg Körpergewicht. Die

Immobilisierung der Mäuse beginnt innerhalb von 5 Minuten, die Chirurgie-Toleranz wird nach 10 Minuten erreicht. Alle Interventionen werden unter nicht sterilen Bedingungen in gesonderten Räumlichkeiten der Tierhaltung durchgeführt. Für PCR-Analyse vorgesehenes Organmaterial wird mit speziellem Instrumentarium behandelt, das zwischen den Eingriffen in 70% Ethanol desinfiziert und mit SDS von RNasen gereinigt wurde.

***In-vivo*-Biopsie von Ohrhaut**

Die *in-vivo*-Biopsie der Ohrhaut vor Induktion der EBA stellt ein wichtiges Element dieser Arbeit dar. Es sollen Unterschiede erfasst werden, die die Versuchstiere schon vor Krankheitsinduktion zeigen. Die erhobenen Unterschiede werden mit dem späteren Verlauf nach Krankheitsinduktion korreliert.

Die narkotisierten Versuchstiere werden zur Identifikation mittels Ohrlochstanze am distalen Ohrrand gekennzeichnet. Die gewonnene Haut wird in flüssigem Stickstoff gefroren (-196 °C) und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. An der entnommenen Stelle enthält die Biopsie zwei Hautschichten mit einer vernachlässigbaren Schicht dazwischen gelegenen lockeren Bindegewebes. Bis zur Krankheitsinduktion (5-6 Tage später) sind die entstandenen Wunden gänzlich verheilt.

***In-vivo*-Exstirpation des drainierenden poplitealen Lymphknotens**

Die *in-vivo*-Entnahme des pathogenetisch relevanten, drainierenden Lymphknotens mit nachfolgender Beobachtung des Krankheitsverlaufs stellt ein weiteres wichtiges Element dieser Arbeit dar. Durch Vergleich der im Lymphknoten erhobenen Parameter mit dem Krankheitsauftreten oder -ausbleiben lassen sich prädiktive Aussagen ableiten.

Die Mäuse werden für diesen Eingriff in X-Stellung gelagert und alle vier Extremitäten kompressionsfrei fixiert. Nach dreimaliger Desinfektion mit 70%igem Ethanol im Operationsgebiet des linken Beines erfolgt der Hautschnitt medial in Längsrichtung im Bereich des Ober- und Unterschenkels (siehe Fig.2.2). Anschließend wird die Vena saphena magna aufgesucht und nach ventral mobilisiert, um die Fasziotomie zu ermöglichen. Im subfaszialen, poplitealen Fettgewebe wird durch stumpfe Präparation der auf ungefähr 5 mm vergrößerte Lymphknoten aufgesucht. Danach werden die hilären Gefäße und Lymphbahnen koaguliert und der vollständig freigelegte Lymphknoten exstirpiert. Über dem entstandenen Weichgewebedefekt adaptiert die Faszie spannungsfrei, ein Verschluss ist nicht notwendig. Die Hautnaht wird in Einzelknopftechnik mit resorbierbarem Nahtmaterial (5-0, Ethicon Vicryl, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt, Deutschland) vorgenommen. Der entnommene Lymphknoten wird in flüssigem Stickstoff gefroren (-196 °C) und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

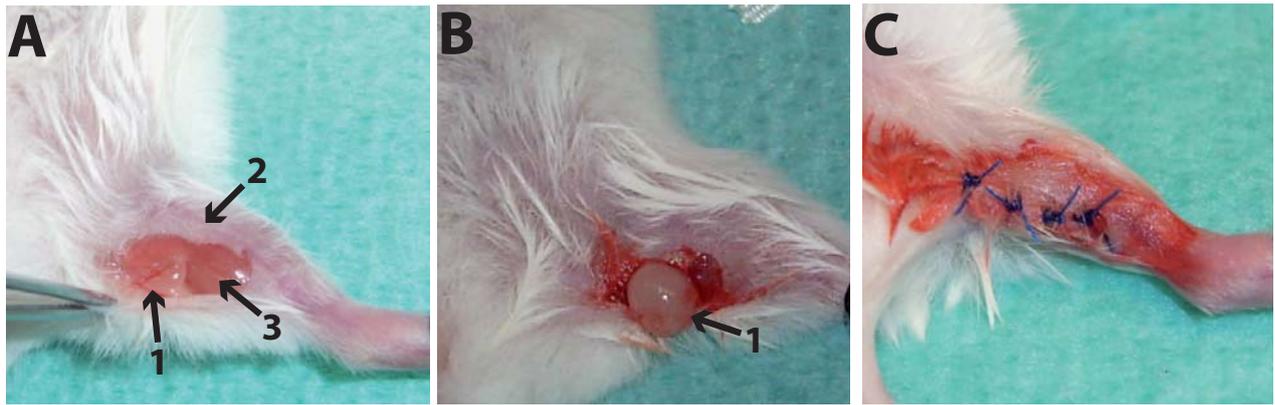


Fig. 2.2: **Exstirpation des poplitealen Lymphknotens (1)**. Weiterhin zu erkennen sind die Vena saphena magna (2) und der Musculus gastrocnemius (3). Nach dem Hautschnitt erfolgt die Identifikation der anatomischen Landmarken (A) und die stumpfe Präparation des Lymphknotens (B). Wundverschluss (C).

Entnahme von venösen Blutproben

Zu den vier genannten Zeitpunkten werden den narkotisierten Tieren 100 μl Blut aus der Schwanzvene entnommen. Die Durchblutung des Schwanzes wird durch Beleuchtung mit einer Rotlichtlampe gefördert. Zur Blutentnahme wird die Maus in einer röhrenförmigen Einrichtung arretiert. Die laterale Schwanzvene wird quer eingeschnitten und das vorgesehene Volumen durch rhythmische Palpation des Schwanzes abgenommen. Das Blut wird bei 4 °C zentrifugiert; anschließend wird das Serum bei -20 °C und das zelluläre Sediment bei -80 °C gelagert.

Endgültige Organentnahme

Nach der vorgesehenen Zeit werden die Mäuse in Narkose durch Begasung mit CO₂ geopfert. Die Entnahme des rechtsseitigen poplitealen Lymphknotens erfolgt in der oben beschriebenen Weise ohne Koagulation und Wundverschluss. Desweiteren werden die Ohren abgetrennt und makroskopisch krankes von gesundem Gewebe mit einem Sicherheitsabstand von 2 mm getrennt. Alle Präparate werden in flüssigem Stickstoff gefroren (-196 °C) und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.4 Färbungen

Immunhistochemie

Die immunhistochemische Anfärbung von Zellpopulationen ermöglicht deren Quantifizierung. Außerdem können die Kompartimente im Lymphknoten identifiziert und deren Fläche quantifiziert werden.

Das für Färbungen vorgesehene Haut- und Lymphknoten-Gewebe wird in Einbettmedium (Tissue-Tek, Sakura-Finetek, Zoerterwonde, Niederlande) bei -20°C fixiert. Die Schichtdicke der Gefrierschnitte beträgt $12\ \mu\text{m}$ (Kyrax, Zeiss, Jena). Nach dem Schneiden erfolgt ein zweistündiges Lufttrocknen. Zur Färbung werden sowohl die APAAP- als auch die Avidin-Biotin-Methode verwendet. Hierbei binden monoklonale Antikörper spezifisch das gesuchte Antigen und werden durch Sekundär- oder Tertiärantikörper und eine enzymatische Reaktion sichtbar.

In Kryoschnitten des Lymphknotens werden T-Zellen durch TCR- β -Färbung markiert (Avidin-Biotin Methode). CD45R/B220 dient zur Markierung der B-Zellen (APAAP- Methode). Proliferierende Zellen werden mit Tec-3/Ki-67 angefärbt (Avidin-Biotin-Methode). Es erfolgt eine Mehrfachfärbung mit TCR- β und CD45R/B220 sowie mit TCR- β und Tec-3/Ki-67.

In den Hautproben werden neutrophile Granulozyten mittels GR-1 identifiziert.

Verwendete Antikörper sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tab. 1: Primärantikörper für immunhistochemische Färbungen.

Antigen	Antikörper Isotyp	Hersteller
CD45R/B220	Ratte IgG2a	BD Biosciences, Heidelberg
TCR- β	Hamster IgG2	BD Biosciences, Heidelberg
Tec-3/Ki-67	Ratte IgG2	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
GR-1	Ratte IgG2	BD Biosciences, Heidelberg
CD138	Ratte IgG2	BD Biosciences, Heidelberg

Die Fixierung der Kryoschnitte erfolgt für 10 Minuten bei -20°C durch ein Methanol-Aceton-Gemisch (Verhältnis 1:1; C. Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe). Anschließend werden die Schnitte zweimal für 5 Minuten mit PBS gespült. Eine erneute Fixierung geschieht durch Inkubation in Paraformaldehyd (Merck KG, Darmstadt) bei -4°C für 45 Minuten. Weitere Spülvorgänge werden mit TBS-T-Lösung unter Schüttelung durchgeführt. Die Inkubation mit Antikörpern erfolgt grundsätzlich in einer dunklen Feuchtkammer.

Die weiteren Arbeitsvorgänge zur Färbung sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tab. 2: Färbeprotokoll für immunhistochemische Anfärbung.*

Arbeitsvorgang	Reagenzien	Inkubationszeit
Primärinkubation	CD45R/B220 (1:100) TCR β (1:100) GR-1 (1:1000)	60 Minuten
Spülen	TBS-T	2 x 5 Minuten
Sekundärinkubation	Ratten-Ig-Fraktion (1:50) in 5%igem Mausserum Extra-Avidin-Peroxidase- Komplex(1:10) Ratten-Ig-Fraktion (1:500) in 5%igem Mausserum	30 Minuten
Spülen	TBS-T	2 x 5 Minuten
Tertiärinkubation	Enzym-Immunkomplex Ratte-APAAP (1:500) Extra-Avidin-Peroxidase- Komplex(1:100)	30 Minuten
Spülen	TBS-T	15 Minuten
Entwicklung	Fast Blue BB Diaminobenzidin Fast Blue BB	25 Minuten 5 Minuten 25 Minuten

*B-Zellen (CD45R/B220; Arbeitsschritte in blau), T-Zellen (TCR β ; Arbeitsschritte in rot) und neutrophile Granulozyten (GR-1; Arbeitsschritte in grün)

Die Anfärbung des Proliferationsmarkers Ki-67 erfolgt mittels Avidin-Biotin-Methode. Nach zehnmütiger Fixierung durch Aceton bei Raumtemperatur werden die Schnitte bei 4°C für 45 Minuten in Paraformaldehyd (4%) inkubiert. Es folgt die Inkubation mit dem TEC-3-Antikörper über Nacht. Zur Sekundärinkubation (30 Minuten) wird Ratten-Ig-Fraktion (1:500) in 5%igem Mausserum verwendet. Dann wird der Extra-Avidin-Peroxidase-Komplex (1:100) für 30 Minuten aufgebracht. Anschließend erfolgt die Anfärbung durch Fast Red für 25 Minuten.

Zur Identifikation Typ-VII-Kollagen-spezifischer Plasmazellen wird eine Triple-Färbung dieser Zellen vorgenommen. Nach einstündiger Inkubation mit biotinyliertem Typ-VII-Kollagen (1:500) wird der Extra-Avidin-Peroxidase-Komplex für 30 Minuten hinzugegeben. Die Entwicklung erfolgt durch Fast Blue für 25 Minuten. Anschließend wird die Anfärbung von CD45R/B220 wie oben beschrieben vorgenommen. Zusätzlich wird Syndecan-1 (CD138) als Marker für Plasmazellen angefärbt. Als Reagenz zum Nachweis von CD138 wird Diaminobenzidin benutzt.

Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Quantifizierung der T-Zell-Proliferation erfolgt mithilfe der Ki-67-Färbung. GR-1 dient zur Markierung von neutrophilen Granulozyten. Typ-VII-Kollagen-spezifische Plasmazellen

werden durch CD138 und Bindung von Typ-VII-Kollagen erkannt. Es werden am Leitz Laborlux 12 100 Kleinquadrate (entspricht $81768 \mu\text{m}^2$ bei 400facher Vergrößerung) ausgezählt. Die Flächenquantifizierung von Haut- und Lymphknotenschnitten erfolgt am Zeiss Axiovert 200 / HAL100 Mikroskop (Zeiss, Jena). Durch computer-gestützte Markierung (Palm@Robo V 2.2.2; P.A.L.M Microlaser Technologies AG, Biebelried) der entsprechenden Flächen können diese (in μm^2) quantifiziert werden. Die Flächen der Kompartimente des drainierenden Lymphknotens werden in Relation zur Gesamtfläche gesetzt.

Fluoreszenzfärbungen

Fluoreszenzfärbungen werden nach der Methode der Direkten Immunfluoreszenz (DIF) angefertigt. Hierbei können im Gewebe vorhandene Antikörper von einem Sekundärantikörper gebunden werden. Dieser Sekundärantikörper ist an einen Farbstoff gekoppelt, der bei Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge ein Emissionsmaximum aufweist. Es wird ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 510UV Meta, Zeiss, Jena) benutzt. Hierdurch ist eine besonders präzise Schärfentiefe mit hoher Auflösung gegeben. Durch die DIF können die einzelnen Antikörper-Subklassen an der dermo-epidermalen Junctionszone sichtbar gemacht werden. Gleiches gilt für die Ablagerung von Komplement durch den Nachweis des Komplementproteins C3.

Die Kryoschnitte der Haut werden für 30 Minuten bei -80°C abgekühlt, um das weitere Arbeiten bei Raumtemperatur zu ermöglichen. Dann erfolgt die Anfärbung der Präparate mit Alexa488-gekoppeltem IgG1 (1:100), FITC-gekoppeltem IgG2b oder FITC-gekoppeltem IgG2c (je 1:100) für eine Stunde. C3 wird durch Fluorescein (1:50) für eine Stunde gefärbt. Für jede Antikörper-Subklasse werden Einzelfärbungen vorgenommen, da bei Mehrfachfärbungen Kreuzdetektion nicht zu vermeiden ist. Zur Kernfärbung wird Hoechst33342 verwendet.

Die Präparate werden direkt nach der Färbung und dem Trocknen unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop fotografiert.

Auswertung der Fluoreszenzfärbungen

Die Präparate werden jeweils unter dem Laser-Scanning-Mikroskop bei der geeigneten Wellenlänge angeregt. Die Einstellungen des Mikroskops werden für jede Antikörper-Subklasse so gewählt, dass eine Emission außerhalb des Detektionsbereiches verhindert wird. Nach dem Fotografieren werden in den Präparaten die Antikörper-tragenden Strukturen markiert. Mittels Auswertungssoftware (Carl Zeiss Image Viewer, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) wird die durchschnittliche Fluoreszenz (Mean Fluorescence Intensity, MFI) des markierten Bereichs abzüglich der Hintergrundfluoreszenz bestimmt. Die durchschnittliche Fluoreszenz ist ein Maß für die Anzahl der gebundenen Antikörper bzw. des abgelagerten Komplements.

2.5 Quantifizierung der Gen-Expression mit der real-time RT PCR

Zur Bestimmung der Gen-Expression wird die mRNA des jeweiligen Gewebes isoliert, in cDNA transkribiert und mithilfe der real-time RT PCR quantifiziert. Zur Analyse der Kompartimente des poplitealen Lymphknoten werden diese mit der Lasermikrodissektion ausgeschnitten. Zudem werden Schnitte des gesamten Lymphknotens, Blutzellen und Hautbiopsien untersucht.

Lasermikrodissektion

Diese Technik dient der Isolierung spezifischer Kompartimente innerhalb des drainierenden Lymphknotens (siehe Fig. 2.3). Es wird eine Toluidin-Blau-Färbung zur Identifizierung der Strukturen verwendet. Die mittels Laser ausgeschnittenen Flächen werden in einem Ölbenetzten Mikrodissektions-Tube gesammelt. Je Kompartiment und Probe werden mindestens $7500000 \mu m^2$ ausgeschnitten, um ausreichend mRNA für eine valide Quantifizierung zu erhalten. Nach Isolation werden die Proben in $350 \mu l$ RLT-Puffer gelöst und bei $-20^\circ C$ konserviert.

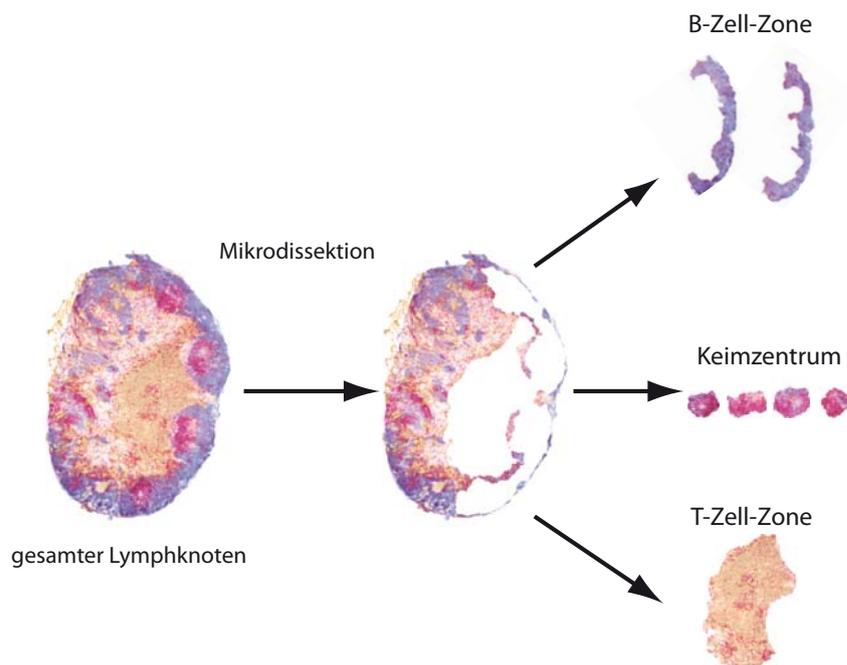


Fig. 2.3: **Lasermikrodissektion:** Durch Laser-Energie lassen sich die einzelnen Kompartimente des Lymphknotens präzise ausschneiden und trennen. Anschließend können die Kompartimente getrennt voneinander untersucht werden. Es wird eine Toluidin-Blau-Färbung benutzt. Hier Darstellung einer immunhistochemischen Färbung. B-Zellen: B220⁺(blau); T-Zellen: TCR β ⁺(braun); proliferierende Zellen: Ki-67⁺(magenta). 2,5fache Vergrößerung. 3fach Färbung durch graphische Projektion aus einer Doppel- und einer Einfach-Färbung.

mRNA-Isolierung

Zur Isolierung der mRNA wird das innuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena AG) benutzt. Proben aus der Mikrodissektion werden bei Raumtemperatur auf 700 μ l mit RLT-Puffer aufgefüllt. Gesamte Lymphknoten und Hautbiopsien werden mittels Kryosektion in mehrere Querschnitte mit einer Gesamtdicke von 120 μ m geteilt. Anschließend erfolgt die Lösung in 700 μ l RLT-Puffer. Blutproben werden im Verhältnis 1:10 mit RLT-Puffer bei einem Gesamtvolumen von 700 μ l verdünnt. Die Proben werden auf einem Rüttler für 1 Minute gemischt. Anschließend werden die Zellwände durch Scherung in 26-Gauge-Kanülen (Braun Sterican, Braun AG, Deutschland) zerstört. Allen Proben werden 700 μ l Ethanol zur Fixierung zugegeben. Die Proben werden durch einen Spinfilter für 2 Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wird verworfen. Der Filter wird mit 500 μ l Washing Solution HS erneut aufgefüllt und zentrifugiert (1 Minute). Dann wird der Filter mit 700 μ l Washing Solution LS befüllt und zentrifugiert (1 Minute). Die nun im Filter isolierte mRNA wird in 60 μ l RNase freiem Wasser gelöst und aus dem Filter heraus zentrifugiert (1 Minute). Es erfolgt bei 60 °C eine Konzentrierung der mRNA auf ein Volumen von 8 μ l (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg).

cDNA-Synthese

Die aus den Proben zusätzlich isolierte DNA wird in einem Gesamtvolumen von 10 μ l in 10x DNase-Puffer durch DNase-Verdau für 15 Minuten bei Raumtemperatur zerstört. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1,5 μ l Stopp-Solution (1,5 mM EDTA-Lösung) beendet. Die mRNA wird anschließend für 10 Minuten bei 70 °C in lineare Struktur gebracht. Die Transkription von mRNA in cDNA erfolgt durch Reverse Transkriptase für 50 Minuten bei 42 °C. 0,5 μ l des Enzyms sind in 8 μ l cDNA Mastermix (4 μ l 5x Puffer; 2 μ l 0,1M DTT; 1 μ l Random Primer; 1 μ l NTP) gelöst. Die Reaktion wird durch Inkubation für 15 Minuten bei 70 °C angehalten. Die gewonnene cDNA wird bei -20 °C gelagert.

Quantitative real-time RT PCR

Die isolierte cDNA wird mittels real-time PCR-Analyse (ABI 7000/7900, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) quantifiziert. Der PCR-Ansatz hat ein Volumen von 20 μ l. Die Zusammensetzung des Mastermix ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 3: Reaktionsansatz für die real-time RT PCR.*

Reagens	Volumen
cDNA	0,625 μ l
Primer- /Primer-Sonden-Mix	2 μ l
2x SYBR-Green/TaqMan Mastermix	10 μ l
DEPC-Wasser	7,375 μ l

*Die cDNA wird aus mRNA der Gewebeproben gewonnen. Bei Verwendung von Primer-Sonden-Mix wird ein Taq-Mastermix verwendet, Tamra dient hierbei als Reporter. Werden nur Primer ohne Sequenz-spezifische Sonde verwendet, wird das Produkt mit SYBR-Green nachgewiesen. Jeder Ansatz enthält standardisiert die gleichen Mengen der vorgegebenen Reagenzien.

Für die Bestimmung mehrere Ziel-cDNA-Sequenzen werden die 20 μ l cDNA in Aliquots aufgeteilt. Die untersuchten Ziel-cDNAs sind im Folgenden aufgelistet.

Als interner Standard jeder Probe dient die mRNA des house-keeping Gens von MLN-51. So kann die relative Expression der einzelnen Gene verglichen werden [12, 63, 65].

Die zyklische Einstellung der real-time RT PCR ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Real-time RT PCR.*

Funktion	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit
initiale Denaturierung	1	95	6 Minuten
Amplifikation	50	95	30 Sekunden
		60	60 Sekunden
Dissoziation	1	95	15 Sekunden
		60	20 Sekunden
		95	15 Sekunden

*Die Programmierung enthält einen initialen Hitze-Zyklus (95 °C für 6 Minuten), der die DNA in lineare Form bringt und Paarungen innerhalb der Stränge verhindert. Es werden 50 Zyklen mit Trennung der Stränge bei 95 °C und anschließender Amplifikation bei 60 °C durchlaufen. Der Dissoziationsschritt dient dem spezifischen Nachweis des Produktes.

Nach dem zweiten Schritt der Amplifikation wird die Fluoreszenz des Produktes gemessen. Der Dissoziationsschritt nach 50 Zyklen dient der Evaluation der Produkt-Spezifität, sofern keine Sequenz-spezifische Sonde benutzt wurde.

Die auf ihre Expression untersuchten Gene sind nach Gewebe aufgeteilt in Tabelle 5 nachzuvollziehen.

Tab. 5: Immunologische Parameter, die mittels real-time RT PCR auf mRNA-Ebene quantifiziert werden.*

	Zellmarker	Transkriptionsfaktoren	Rezeptoren	Zytokine Chemokine
Blut	CD3 CD19 CD11c CD69 GR-1 Mac-1		Fc γ RI Fc γ RII Fc γ RIII Fc γ RIV C5aR	IL1 β IL4 IL6 IL17 IL18 IL21 IL27 IL33 MIP-1 α
Haut	CD3 CD19 CD11c GR-1 Mac-1		Fc γ RI Fc γ RII Fc γ RIII Fc γ RIV C5aR	TNF IFN γ IL1 β IL3 IL4 IL9 I10 IL18 IL33 KC MIP-1 α RANTES
pLK\blacklozenge	CD3 CD19 CD11c CD69 GR-1 Mac-1	RGS16 FoxP3 RoR γ t	Fc γ RI Fc γ RII Fc γ RIII Fc γ RIV CXCR5	CXCL13 BAFF IL2 IL4 IL6 IL10 IL12p35 IL12p40 IL17 IL21 IL27 IFN γ LT β TGF β TNF

*Die Sequenzen der Primer und Sonden sind im Anhang aufgeführt. Die Auswahl entsprechend der Gewebe erfolgt gemäß dem aktuellen Stand der Wissenschaft, der in Kapitel 1.2 ("Die adaptive Immunantwort") erläutert wurde. Zusätzlich wird in der Haut noch die Expression von Typ-VII-Kollagen und im Lymphknoten das Enzym AID bestimmt. \blacklozenge peripherer (=poplitealer) Lymphknoten.

Datenauswertung der real-time RT PCR

Die Proben werden in Doppelansätzen bestimmt. Bei zu geringer cDNA Menge für MLN-51 erfolgt die Wiederholung im Einzelansatz. Das MLN-51 Gen kodiert für ein Transport-Protein, das für den Transport von mRNA vom Zellkern ins Zytoplasma verantwortlich ist. Es liegt hoch konserviert in Säugetier-Organismen vor [81]. Als house keeping Gen ist es zur Bestimmung der relativen Expression von Genen geeignet [12, 65]. Die relative Expression jedes Ziel-Gens wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{Kopien_{Ziel-Sequenz}}{Kopien_{MLN-51}} = 2^{-(Zyklen_{Ziel-Sequenz} - Zyklen_{MLN-51})} \quad [8]$$

2.6 Detektion von Typ-VII-Kollagen-spezifischen Antikörpern durch ELISA

Durchführung

Zum quantitativen Nachweis der EBA-spezifischen Antikörper gegen Typ-VII-Kollagen wird ein ELISA verwendet. 96-Well-Platten werden mit mCol7C in der Konzentration 4,6mg/ml über 24 Stunden bei 4°C beschichtet. Als Standard wird Maus-Referenzserum (Bethyl Laboratories, Texas, USA) zur Beschichtung verwendet. Die zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Blutproben werden in Serum und korpuskuläre Anteile getrennt. Das Serum (Lagerung: -20°C) wird aufgetaut und in 4 Verdünnungsstufen (1:1000; 1:5000; 1:25000; 1:125000) mit Sample Diluent (8,2g/l NaCl; 6,1g/l Tris; 10g/l BSA; 0,5ml/l Tween20; pH=8) verdünnt. Nach Beschichtung erfolgt dreimaliges Auswaschen der Wells mit Washing Solution (82g/l NaCl; 61g/l Tris; 5ml/l Tween20; pH=8). Unspezifische Bindungen werden durch einstündige Inkubation mit Blocking Solution (8,2g/l NaCl; 6,1g/l Tris; 10g/l BSA; pH=8) bei Raumtemperatur auf dem Rüttler vermindert. Nach zweimaligem Waschen der Wells werden 100 μ l der Probenverdünnungen im Doppelansatz aufgetragen. Als Standard werden bekannte Konzentrationen der Antikörper-Subklassen IgG1, IgG2b und IgG2c (Goat-Anti-Mouse; Bethyl Laboratories, Texas, USA) aufgetragen. Es erfolgt eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach weiterem Waschen werden die Wells mit Sekundärantikörpern gegen IgG1, IgG2b und IgG2c (Goat-Anti-Mouse; Bethyl Laboratories, Texas, USA) beschichtet. Diese Antikörper sind HRP-gekoppelt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Rüttler für eine Stunde und weiterem Waschen der Wells werden die Proben mit TMB (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland) entwickelt. Die Reaktion wird durch Zugabe von H₂SO₄ (20 vol%) beendet. Die Messung der Extinktion erfolgt bei 450 nm (μ Quant, Bio-Tek Instruments, UK).

Auswertung

Den Extinktionswerten der Standardreihe werden die verschiedenen Standard-Konzentrationen der Antikörper-Subklassen zugeordnet. Es entsteht eine sigmoidale Standardkurve, die durch Regression der Funktion $y = a(1 - e^{-bx})^c$ (sigmoidale Regression nach Chapman, 3 Parameter; SigmaPlot 11; Systat Software GmbH, Erkrath) zugeordnet werden kann. Durch Einsetzen der Extinktionswerte für y wird die Konzentration der Probe berechnet und mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert. Alle Proben werden in vier abnehmenden Konzentrationen gemessen. Die Werte werden nur in die Auswertung einbezogen, wenn nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor konstante Konzentrationen errechnet werden.

2.7 Messung der Myeloperoxidase(MPO)-Aktivität in Hautproben

Durchführung

Die Myeloperoxidase (MPO) dient zur Identifikation neutrophiler Granulozyten. Die Quantifikation der Myeloperoxidase schätzt die inflammatorische Aktivität ab. Es wird ein enzymatischer Assay mit TMB als Substrat benutzt [110]. Kranke und gesunde Hautproben (Ohrhaut) werden in einem 0,05 M Kupfer-Phosphatpuffer bei pH=6 und 4 °C homogenisiert (IKA TC10 basic homogener workcenter; IKA Werke GmbH, Staufen, Deutschland). Es erfolgt die Zugabe von HTMB, das die lysosomalen Membranen zerstört und die enthaltene MPO freisetzt. Die homogenisierte Hautprobe wird anschließend dreimal für jeweils 15 Minuten bei -80 °C gefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut. Es folgt eine Zentrifugation bei 4 °C und 12000 g für 10 Minuten (Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland). Der Überstand wird abgehoben und bei -20 °C gelagert. Die auf diese Weise hergestellten Proben werden in fünf Stufen verdünnt. Die Messung erfolgt im Doppelansatz. Als Standard dient humane MPO, die ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen verdünnt wird. Die Messung der Enzymaktivität erfolgt bei Raumtemperatur in 96-Well-Platten. Als Substrat wird TMB verwendet. Die Reaktion wird durch Zugabe von H₂SO₄ (20 vol%) beendet. Die Messung der Extinktion erfolgt bei 450 nm.

Auswertung

Die Extinktion der Standard-Konzentration verläuft linear. Die Extinktion der Proben wird auf der Standardgerade einer Konzentration zugeordnet und mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert. Die Werte werden nur in die Auswertung einbezogen, wenn nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor konstante Konzentrationen errechnet werden.

2.8 Grafiken und Statistik

Die statistische Auswertung verfolgt einen deskriptiven Ansatz (ohne α -Adjustierung). Der Vergleich zweier unabhängiger Versuchsgruppen erfolgt unter der Verwendung des MANN-WHITNEY U-Tests. Für den Vergleich voneinander abhängiger Versuchsgruppen findet der WILCOXON Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Proben Verwendung. Hierbei gilt die Annahme, dass in den untersuchten Populationen keine Normalverteilung vorliegt. Als statistisch signifikant gilt ein Wert $p < 0,05$ (Markierung: *). Kleinere p-Werte werden entsprechend gängiger Konvention gekennzeichnet ($p < 0,01 \Rightarrow **$; $p < 0,001 \Rightarrow ***$).

Korrelationen werden nach der Methode der Produkt-Moment-Korrelation nach PEARSON und BRAVAIS berechnet. Es gelten die oben genannten Signifikanzgrenzen. Schwellenwerte für die Expression einzelner Gene werden mit der Receiver Operating Characteristic (ROC) - Methode berechnet. Hierbei wird der Wert genutzt, der die höchste Likelihood Ratio für das

Ergebnis “krank” wiedergibt. Die getestete Population wird anhand dieses Schwellenwertes charakterisiert. Der positiv prädiktive Wert wird durch Division der Anzahl kranker Tiere mit einem Ergebnis über dem Schwellenwert durch die Gesamtzahl kranker Tiere berechnet. Der negativ prädiktive Wert wird durch Division der Anzahl gesunder Tiere mit einem Ergebnis unter dem Schwellenwert durch die Gesamtzahl gesunder Tiere berechnet.

Für statistische Berechnungen und Erstellung von Graphen wird SigmaPlot® Software (Version 11.0, Systat® Software, Inc., Chicago, USA) verwendet. Die farbliche Bearbeitung sowie Zusammenfassung von Graphen erfolgt durch Adobe® Illustrator® CS3® Software (Version 13.0.2, Adobe Systems Incorporate, San Jose, USA) und Adobe® Photoshop® CS3® Software (Version 10.0.1, Adobe Systems Incorporate, San Jose, USA).

Die vorliegende Dissertation wurde mit LyX (Version 2.0.0, © 1995-2011 LyX Team) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung zum Auftreten und Ausbleiben von EBA-Symptomen

Nach Krankheitsinduktion mit rekombinantem mCol7C als Emulsion in Titermax erkrankten 80% der SJL-Mäuse an EBA.

Durch Krankheitsinduktion von 8-10 Wochen alten, weiblichen SJL-Mäusen mit mCol7C, einem Fragment der NC1-Domäne des Typ-VII-Kollagen, gemeinsam mit dem Adjuvans Titermax kann die EBA ausgelöst werden. Es entstehen Hautläsionen, die makroskopisch dem inflammatorischen Typ der EBA ähneln. Hierbei handelt es sich um Blasen und hämorrhagische Erosionen, die mit Narben und Milien abheilen. Auch reversibler Haarverlust wird beobachtet. Sofern die Krankheitssymptome auftreten, sind immer die Ohren betroffen. Prädilektionsstellen sind weiterhin der Kopf, der kopfnaher Bereich des Rückens sowie der Schwanz (Fig. 3.1). Außerdem können die Schleimhäute der Augen und der Mundhöhle betroffen sein. Von 100 Tieren erkrankten 80% und 20 % bleiben gesund. Die gesunden Tiere zeigen neben der unspezifischen Schwellung der Injektionsstelle (Fußsohlen) keine Krankheitssymptome. Dies entspricht den Daten der Literatur [116].



Fig. 3.1: EBA-typische Läsionen bei erkrankten SJL-Mäusen nach Krankheitsinduktion mit mCol7C und Titermax. Prädilektionsstellen sind die Ohren (A,B). Desweiteren treten die Blasen und Erosionen im Bereich der Hinterbeine und des Schwanzes auf (C). Die Symptome sind im Verlauf progredient und heilen bis zum Versuchsende (10 Wochen nach Krankheitsinduktion) nicht ab. Während der Untersuchung in Narkose sind die Augen zum Schutz gegen Austrocknung mit Feuchtigkeitsschnee (Bepanthen®) bedeckt.

Die operative Entfernung eines drainierenden Lymphknotens zwei Wochen nach Krankheitsinduktion verändert das klinische Bild der experimentellen EBA nicht.

Betrachtet man den Maximalscore der operierten und der nicht operierten Tiere, zeigt sich kein Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen (siehe Fig. 3.2). Durch die operative Entnahme des linken poplitealen Lymphknotens wird demnach der Verlauf des Experimentes nicht relevant beeinflusst.

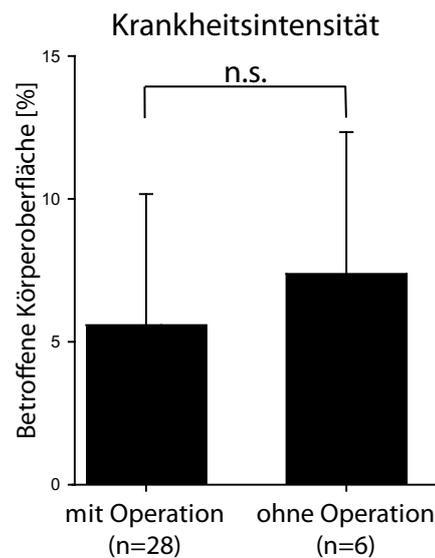


Fig. 3.2: Vergleich von Mäusen, denen nach zwei Wochen der linke popliteale Lymphknoten entfernt wurde, mit nicht operierten Mäusen. Zum Zeitpunkt der Operation sind alle Tiere gesund. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Schwere der EBA (in % maximal betroffener Körperoberfläche) im weiteren Verlauf. Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels MANN-WHITNEY U-Test; n.s. = $p > 0,05$.

Der Krankheitsverlauf nach Krankheitsinduktion lässt unterschiedliche Schweregrade unterscheiden.

Nach einmaliger Krankheitsinduktion der 8 Wochen alten Mäuse vom SJL-Stamm lassen sich nach 3 bis 4 Wochen die ersten Krankheitssymptome beobachten. Bei wöchentlicher Evaluation des Krankheitsverlaufes zeigt sich, dass 6 von 28 Tieren (21,43%) einen besonders schweren Krankheitsverlauf aufweisen. Neben den gesunden Tieren ($n=6$; 21,43%) lässt sich eine weitere Kohorte beschreiben, deren Krankheitsschwere in einem Kontinuum zwischen gesund und schwer erkrankt liegt. Diese Kohorte macht mit 16 von 28 Tieren (57,14%) die Mehrheit der immunisierten Tiere aus. Diese Tiere zeigen EBA-spezifische Krankheitszeichen; sie werden deshalb als intermediär krank definiert. Bei genauerer Betrachtung der Fig. 3.3 zeigt sich, dass die schwer erkrankten Tiere bis zur 5. Woche keinen signifikanten Unterschied der betroffenen Körperoberfläche verglichen mit den intermediär erkrankten Tieren zeigen. Ab der 6. Woche nach Krankheitsinduktion wird der intensive Krankheitsverlauf deutlich. Dieser Unterschied zu den intermediär erkrankten Tieren bleibt bis zum Ende des Experimentes erhalten; ab der 8. Woche ist bei den schwer erkrankten Tieren eine leichte Reduktion bezüglich der betroffenen KOF zu verzeichnen. Die intermediär kranken Tiere hingegen zeigen einen in der dritten Woche beginnenden stetigen Anstieg des Krankheitscore, der bis zur zehnten Woche andauert. Bei der Betrachtung der von den Tieren erreichten Maximal-Scores unabhängig vom Zeitpunkt der Messung (siehe Fig. 3.3) zeigt sich der erhebliche Unterschied zwischen den drei beschriebenen Gruppen. Die Streu-

ung des Maximalscore ist in der Gruppe der stark erkrankten Tiere wiederum größer als die Streuung bei den intermediären Tieren. Diese Ergebnisse entsprechen den bekannten Daten in der Literatur [116].

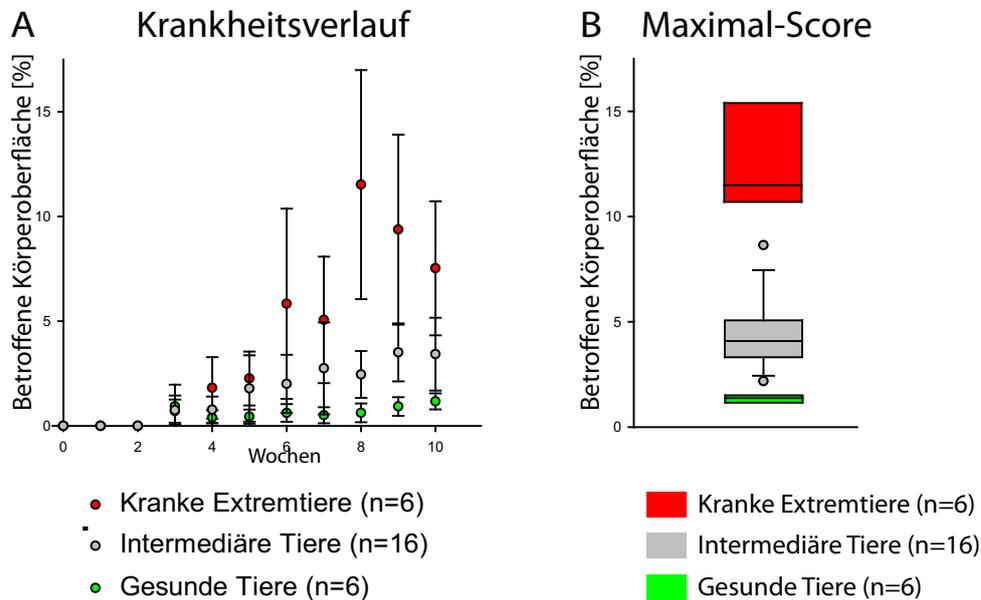


Fig. 3.3: **Krankheitsverlauf (A) und Maximal-Score (B) der experimentellen EBA (in % betroffener Körperoberfläche)**. Es ist im zeitlichen Verlauf eine Gruppe besonders schwer erkrankter Tiere zu erkennen, die von einer intermediären Gruppe sowie den gesunden Tieren zu unterscheiden ist (A). Die kranken Extremtiere sind 8 Wochen nach Krankheitsinduktion am schwersten betroffen. Bei Betrachtung des maximal erreichten Krankheitsgrades sind diese Gruppierungen ebenfalls nachzuvollziehen (B). Darstellung in B als Boxplot mit Median, 25., 75. Perzentile und Ausreißern. $n_{gesamt}=28$; $n_{krank}=22$ (78,57%); $n_{gesund}=6$ (21,43 %)

Auswertung des drainierenden Lymphknotens nach Symptomentstehung oder -ausbleiben

Der Lymphknoten stellt das Zentrum der Immunantwort in dem vorliegenden Modell dar. Nach Ausbruch oder Ausbleiben von Krankheitssymptomen wurde den Versuchstieren der verbleibende rechte popliteale Lymphknoten entfernt und mittels Quantifizierung der mRNA die Immunantwort zu diesem späten Zeitpunkt (Woche 10) charakterisiert. Es zeigt sich im Gesamtlymphknoten eine höhere Expression von IL21 bei kranken im Vergleich zu gesunden Tieren (siehe Fig. 3.4). Alle anderen Th1-, Th2- oder Th17-assoziierten Zytokine zeigen zu diesem Zeitpunkt keinen signifikanten Anstieg sowohl im Gesamtlymphknoten als auch in den spezifischen Kompartimenten (Daten nicht gezeigt, Liste der untersuchten Gene siehe Tabelle 6). Quantifiziert man als Maß für die Intensität der Immunantwort die Typ-VII-Kollagen-spezifischen Plasmazellen in diesen Lymphknoten, so lässt sich eine größere Zahl dieser Zellen bei kranken als bei gesunden Tieren nachweisen (siehe Fig. 3.5). Diese Plasmazellen sind nahezu ausschließlich in der Medulla des Lymphknotens angesiedelt. Um diesen

Unterschied zu erklären, muss die Ausreifung von Typ-VII-Kollagen-spezifischen Plasmazellen in den Keimzentren unterschiedlich sein. Als ein Faktor dieser Ausreifung lässt sich die Affinitätsreifung mittels Immunfluoreszenz quantifizieren (siehe Abschnitt 2.4.4). Diese ist jedoch nach zehn Wochen bei kranken und gesunden Tieren gleich stark ausgeprägt ($p=0,2$; Daten nicht gezeigt).

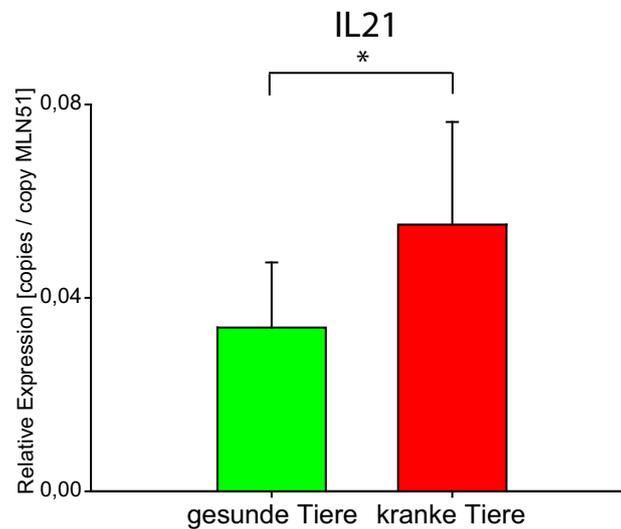


Fig. 3.4: **Expression von IL21 zehn Wochen nach Krankheitsinduktion.** Zu diesem Zeitpunkt wird zwischen kranken und gesunden Tieren differenziert. Kranke Tiere zeigen eine stärkere Expression von IL21. IL21 wird einer Th17-Immunantwort zugerechnet. Alle weiteren Zytokine, Zellmarker oder Transkriptionsfaktoren zeigen keinen Unterschied zwischen kranken und gesunden Tieren. Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Tests; * $p < 0,05$; (je $n=10$).

Tab. 6: **Immunologische Parameter, die im gesamten Lymphknoten, in T- und B-Zell-Zone sowie Keimzentrum 10 Wochen nach Krankheitsinduktion quantifiziert werden.***

Zellmarker	Transkriptions-faktoren	Rezeptoren	Zytokine Chemokine
CD3 CD19			CXCL13 BAFF
CD11c	RGS16	Fc γ RI Fc γ RII	IL2 IL4 IL6 IL10
CD69	FoxP3	Fc γ RIII Fc γ RIV	IL12p35 IL12p40
GR-1	RoR γ t	CXCR5	IL17 IL21 IL27 IFN γ
Mac-1			LT β TGF β TNF

*In **rot** hervorgehoben ist der Parameter, der einen signifikanten Unterschied zwischen erkrankenden und gesund bleibenden Tieren zeigt. Die Auswahl der Gene erfolgt entsprechend dem aktuellen Stand der Wissenschaft, der in Kapitel 1.2 ("Die adaptive Immunantwort") erläutert wurde. Zusätzlich wird die Expression des Enzyms Activation Induced Cytidin Deaminase (AID) bestimmt.

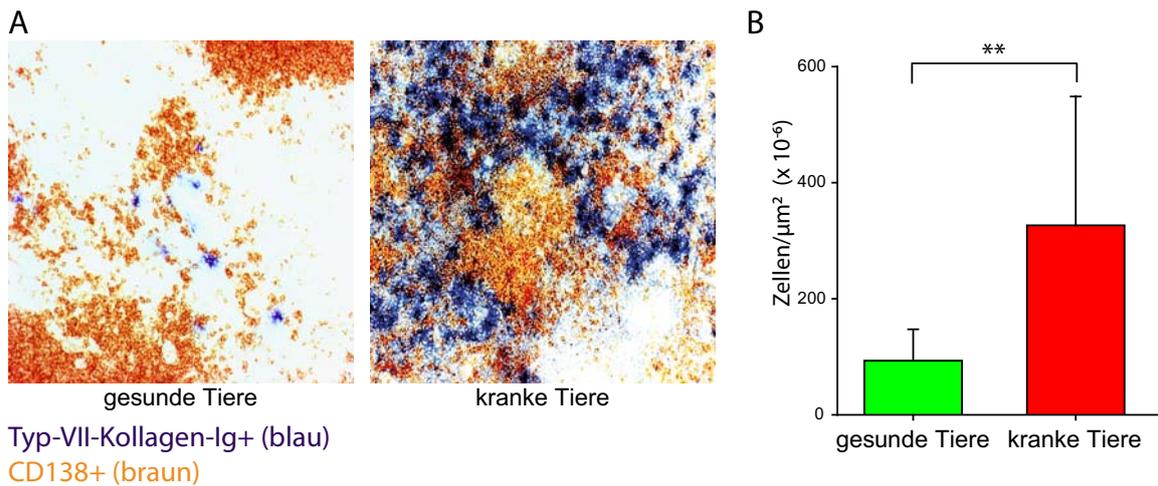


Fig. 3.5: Quantifizierung von Typ-VII-Kollagen-spezifischen Plasmazellen zehn Wochen nach Krankheitsinduktion im poplitealen Lymphknoten. Die Plasmazellen wurden immunhistochemisch mit CD138 (Syndecan-1) markiert. Die Antigen-Spezifität wurde durch den Nachweis Typ-VII-Kollagen-spezifischer B-Zell-Rezeptoren bestimmt (A). Nach zehn Wochen ist bei den kranken Tieren eine höhere Anzahl pathogenetisch relevanter Plasmazellen nachzuweisen (B). Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; (je $n=6-10$); Vergrößerung 400x.

Die Krankheitssymptome sind mit einer Antikörper-vermittelten Entzündung an der DEJ assoziiert.

Da die Anzahl Typ-VII-Kollagen-spezifischer Plasmazellen in den Lymphknoten kranker Tiere erhöht ist, habe ich untersucht, welche Relevanz dies im Verlauf der folgenden Immunantwort hat; deshalb habe ich die Menge der Antikörper gegen Typ-VII-Kollagen im Serum der Tiere verglichen. Hierfür wurde ein Antigen-spezifischer ELISA verwendet. Durch repetitive Blutabnahme lässt sich der zeitliche Verlauf der Antikörper Konzentration beobachten (siehe Fig. 3.6). Alle Tiere bilden nach der Krankheitsinduktion Antikörper der drei Subklassen IgG1, IgG2b und IgG2c gegen Typ-VII-Kollagen. Bei Betrachtung der Antikörper-Subklassen IgG1 und IgG2b zeigt sich bis zur vierten Woche kein Unterschied zwischen kranken und gesunden Tieren. Nach vier Wochen ist die Konzentration dieser Antikörper bei kranken höher als bei gesunden Tieren, um anschließend wieder auf das Niveau der gesunden Tiere abzufallen. Anders verhält es sich dagegen bei der Subklasse IgG2c. Hier ist ab der zweiten Woche ein signifikanter Unterschied zwischen gesunden und kranken Tieren festzustellen. Die Konzentration dieses Antikörpers ist bei kranken Tieren mit einer Ausnahme (8 Wochen; $p=0,11$) auch im Verlauf erhöht. Der größte Unterschied besteht sechs Wochen nach Krankheitsinduktion. Während bei den Subklassen IgG1 und IgG2b bei kranken und gesunden Tieren ein konstantes Niveau der Konzentration im Serum nach sechs Wochen erreicht ist, steigt die IgG2c-Konzentration sowohl bei kranken als auch bei gesunden Tieren bis zum Ende des Experimentes an.

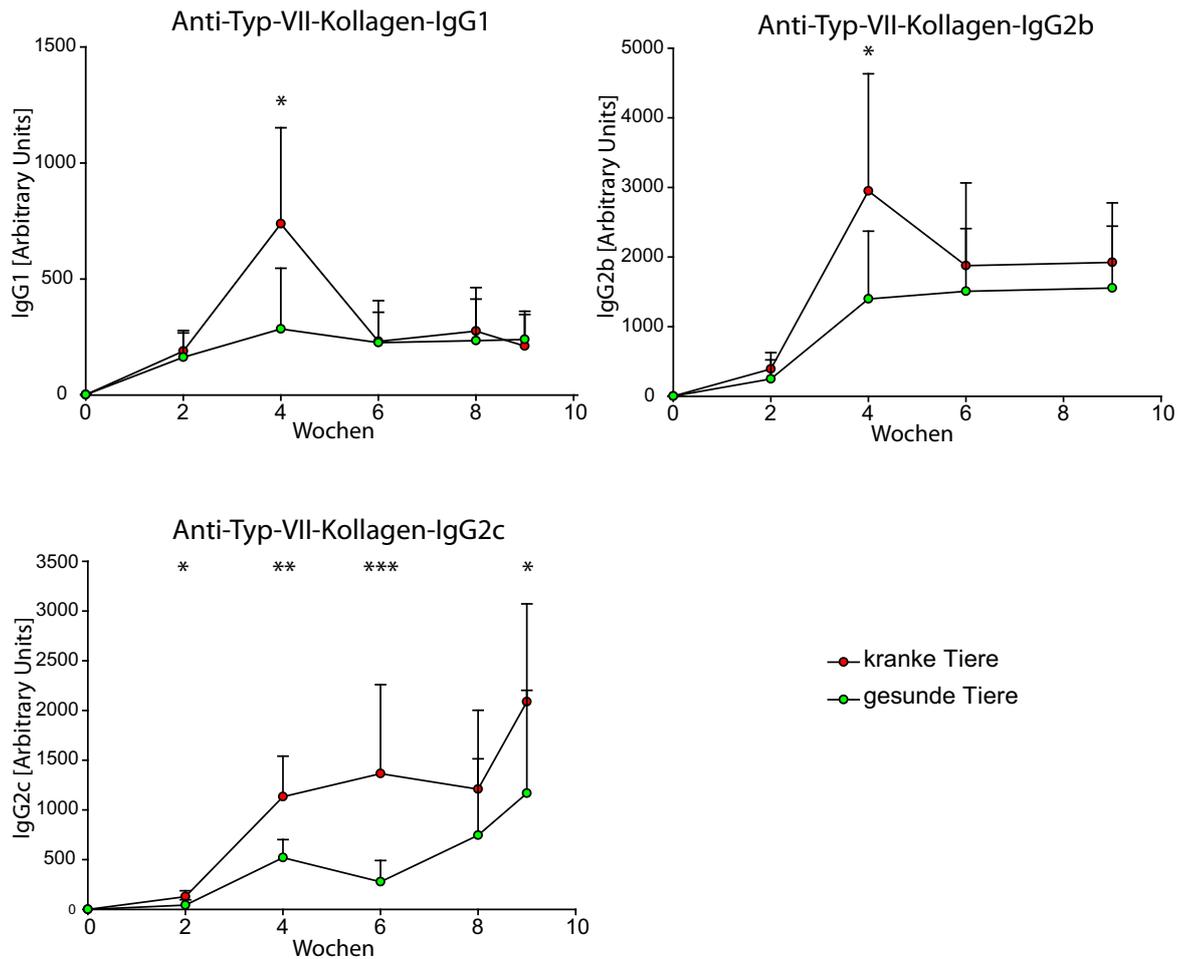


Fig. 3.6: **Quantifizierung der Anti-Typ-VII-Kollagen IgG-Subklassen.** Die Quantifizierung erfolgt mittels ELISA im Serum der Tiere. Die Serumproben wurden alle 2 Wochen entnommen. Das Komplement-bindende IgG2c ist im Verlauf bei kranken Tieren in größerer Konzentration nachweisbar als bei gesunden Tieren. Sowohl IgG2b als auch das inhibitorische IgG1 ist bei kranken Tieren nur nach 4 Wochen erhöht. Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (je $n=10$).

Als Konsequenz der Antikörper-Bildung habe ich die Anzahl der Antikörper gegen Typ-VII-Kollagen an der DEJ bestimmt. Nach Aufarbeitung von Hautproben für die Auswertung mittels DIF zeigt sich eine Ablagerung von Antikörpern an der DEJ, die spezifisch gegen Typ-VII-Kollagen gerichtet sind. Es lassen sich Antikörper vom IgG-Typ mit den Subklassen IgG 1, IgG2b und IgG2c identifizieren. Diese Antikörper sind in linearer Formation am Zielprotein in der genannten Übergangszone angeordnet. Es findet keine Antikörper-Bindung an anderen Strukturen der Epidermis oder Dermis statt. Die Antikörper-Bindung ist nicht gleichmäßig; es gibt Orte, an denen eine besonders starke Fluoreszenz eine hohe Antikörper-Dichte andeutet. Auch in gesunder Haut kommt es zu der beschriebenen Antikörper-Deposition. Durch Quantifizierung der durchschnittlichen Fluoreszenz (siehe Abschnitt 2.4.4) der einzelnen Antikörper-Subklassen mittels DIF an der DEJ von kranken und gesunden Tieren lässt sich beschreiben, wie viele Antikörper der jeweiligen Subklasse am Typ-VII-Kollagen gebunden haben. Vergleicht man die Antikörper-Deposition für die Subklassen

IgG1 und IgG2b zwischen kranken und gesunden Tieren, so zeigt sich kein Unterschied bezüglich der Deposition (Daten nicht gezeigt). Die Deposition der IgG-Subklasse IgG2c ist jedoch bei kranken Tieren im Vergleich zu gesunden Tieren erhöht (siehe Fig. 3.7).

Neben der Bindung von Antikörpern an der DEJ kann mittels DIF die Deposition des Komplementfaktors C3 an der DEJ bestimmt werden. Diese Komplement-vermittelte Entzündung ist zu einem gewissen Ausmaß bei allen Tieren feststellbar. Vergleicht man jedoch die C3-Deposition an der DEJ bei kranken und gesunden Tieren, wird deutlich, dass kranke Tiere eine höhere Menge C3 an der DEJ gebunden haben als gesunde Tiere (siehe Fig. 3.7).

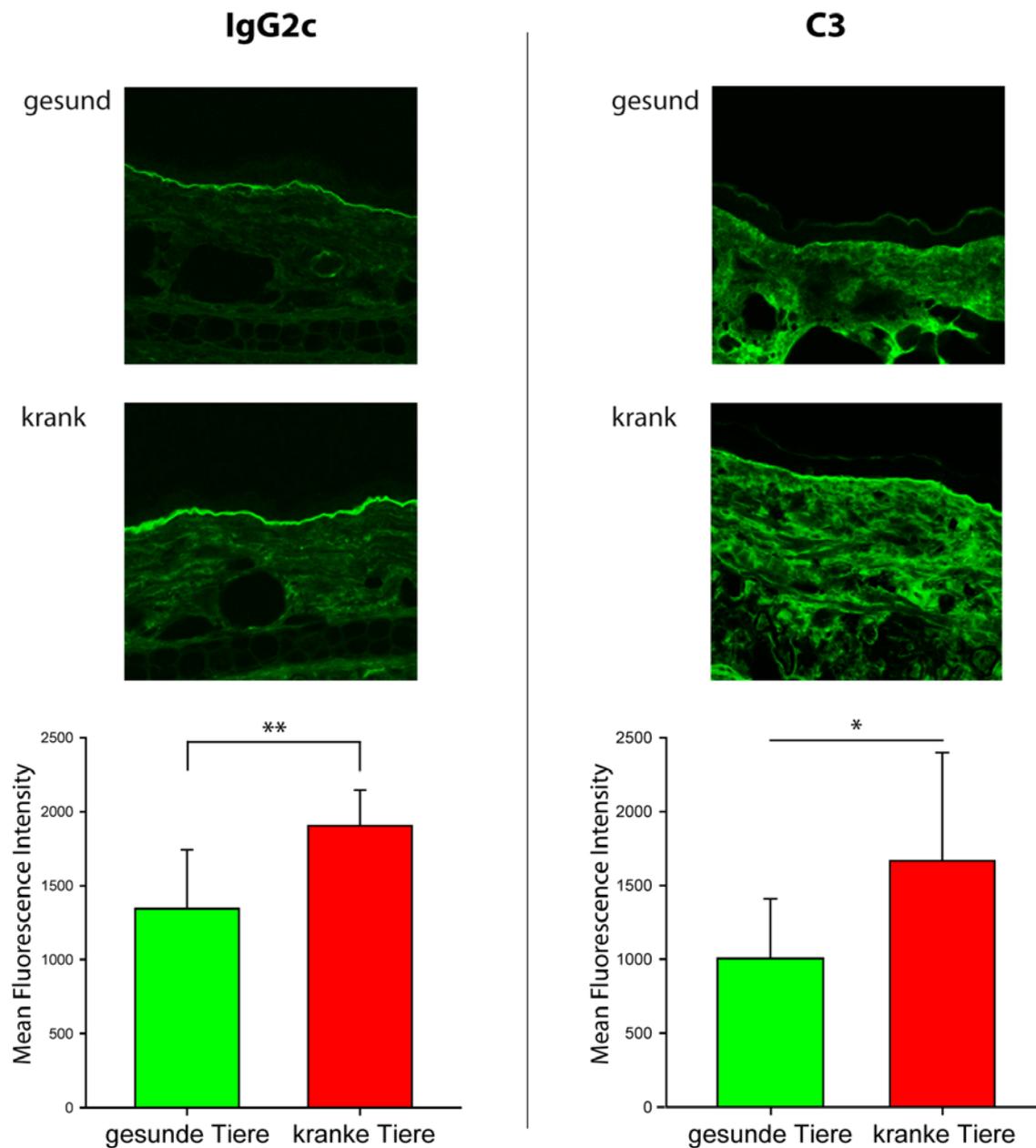


Fig. 3.7: **Quantifizierung der IgG2c- und C3-Deposition am Typ-VII-Kollagen der DEJ.** Die Proben (Zeitpunkt: 10 Wochen) wurden mittels Direkter Immunfluoreszenz (DIF) analysiert. Kranke Tiere weisen eine größere Zahl komplement-aktivierender IgG2c-Antikörper an der DEJ auf. Konsekutiv weisen sie auch eine stärkere Komplement-Ablagerung in der Haut auf. Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich durch MANN-WHITNEY U-Test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (je $n=10$). Vergrößerung 400x.

Als Auswirkung der Antikörper-Bindung und Komplement-Aktivierung lässt sich die Infiltration von Entzündungszellen quantifizieren. Bei der EBA handelt es sich bei den einwandernden Zellen nach Erkenntnissen aus *in-vitro*-Versuchen vorwiegend um neutrophile Granulozyten [118]. Um die Entzündung und den verantwortlichen Zelltyp auch *in vivo* zu charakterisieren, habe ich die neutrophilen Granulozyten in der Haut auf mRNA-Ebene durch Expression von GR-1, auf Protein-Ebene durch GR-1-Färbung sowie funktionell durch

einen MPO-Assay quantifiziert. Wird die Infiltration neutrophiler Granulozyten in der Haut zwischen kranken und gesunden Tieren verglichen, zeigt sich (unabhängig von der Methodik) bei den kranken Tieren eine größere Zahl von neutrophilen Entzündungszellen in den betroffenen Hautpartien als in der Haut der gesunden Tiere (siehe Fig. 3.8). Die Infiltration neutrophiler Granulozyten bleibt bei gesunden Tieren also trotz Antikörper-Deposition an der DEJ aus. Die GR-1-mRNA unterscheidet sich bei gesunden Tieren vor und nach Krankheitsinduktion nicht (Daten nicht gezeigt), so dass durch die PCR als empfindlichste Methode eine relevante Infiltration neutrophiler Granulozyten in die Haut gesunder Tiere widerlegt ist.

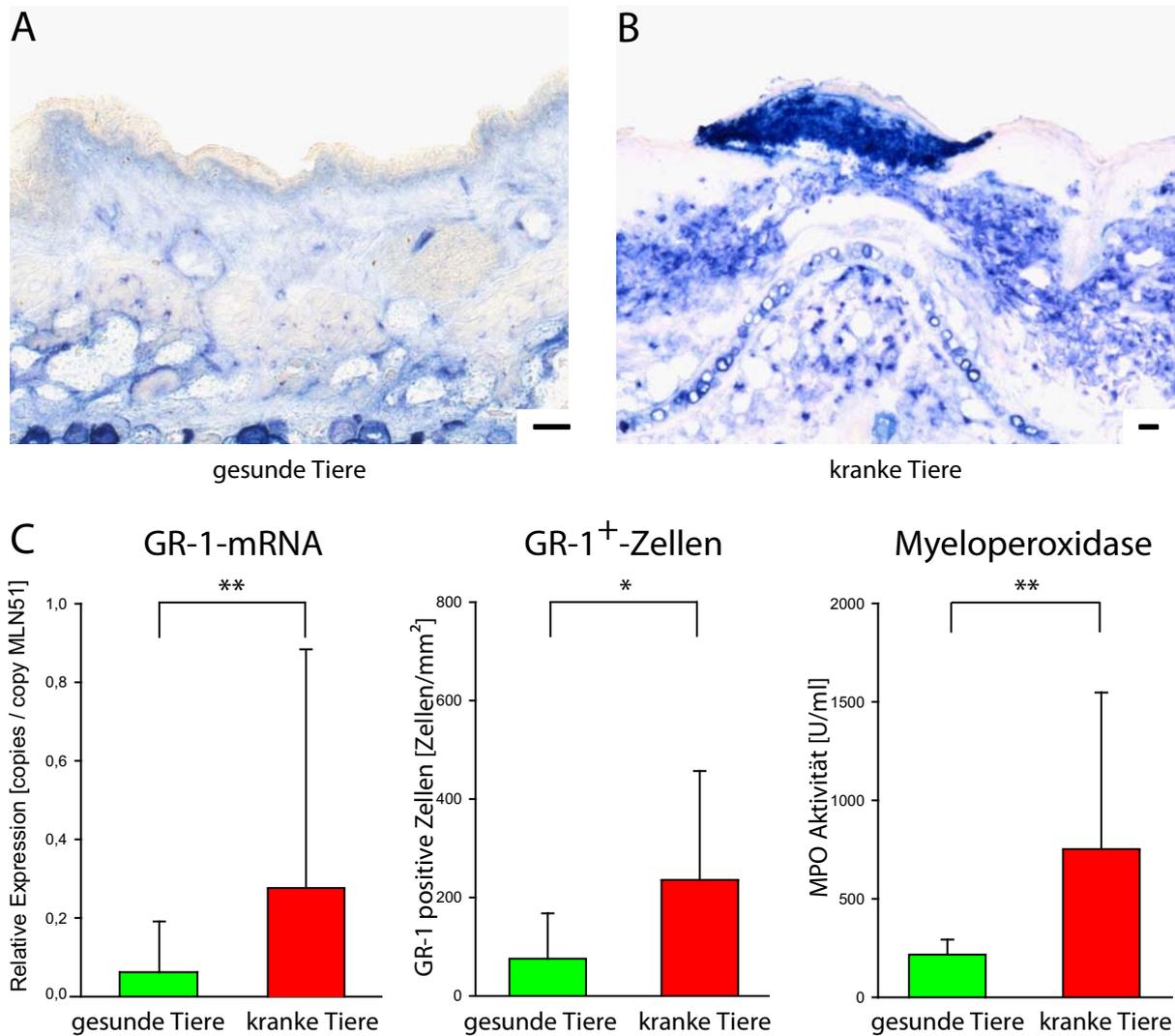


Fig. 3.8: **Quantifizierung der Entzündungsaktivität in der Haut.** Kranke Tiere weisen mehr neutrophile Granulozyten auf, was den inflammatorischen Charakter der Krankheit unterstreicht (A,B). Das neutrophile Infiltrat (B) zeigt die Entzündung an, die zu den Hautläsionen führt. Die Quantifizierung der neutrophilen Granulozyten (C, GR-1-mRNA, GR-1⁺-Zellen, MPO-Aktivität) in der Ohrhaut von kranken und gesunden Tieren bestätigt das mikroskopische Bild. Balken=200 μ m; Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Tests, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (je $n=10$).

Fc γ IV wird nur in der Haut kranker Tiere verstärkt exprimiert.

Da die Einwanderung neutrophiler Granulozyten mit der Entstehung der Krankheitssymptome assoziiert ist, habe ich die eingewanderten Zellen mittels real-time RT PCR genauer charakterisiert. Hierfür habe ich die Gene der Antikörper-Rezeptoren Fc γ RI, IIb, III und IV hinsichtlich ihrer Expression in Hautproben untersucht. Die nachgewiesene mRNA dieser Rezeptoren ist vornehmlich den neutrophilen Granulozyten zuzurechnen [128]. Es zeigt sich bei Betrachtung der Expression der Fc γ -Rezeptoren, dass kranke und gesunde Tiere

die Rezeptoren Fc γ RI, IIb, III verglichen mit vor der Krankheitsinduktion stärker exprimieren. Eine Ausnahme stellt Fc γ RIV dar. Dieser Rezeptor wird ausschließlich in der Haut kranker Tiere stärker als vor der Krankheitsinduktion exprimiert. Gesund gebliebene Tiere zeigen keine Änderung der Expression von Fc γ RIV nach Krankheitsinduktion. Zusätzlich exprimieren kranke Tiere die aktivierenden Fc γ -Rezeptoren I, III und IV stärker als gesunde Tiere. Der inhibierende Fc γ Rezeptor IIb wird jedoch von kranken und gesunden Tieren ohne Unterschied in der Haut exprimiert. Bei Berechnung der Ratio von aktivierenden Fc γ Rezeptoren (I, III und IV) zum inhibitorischen Fc γ RIIb fällt auf, dass bei gesunden Tieren das Verhältnis zwischen aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren kleiner ist als bei kranken Tieren und dass dieses Verhältnis nur in kranken Tieren nach der Krankheitsinduktion ansteigt, während es bei gesunden Tieren unverändert bleibt (siehe Fig. 3.9).

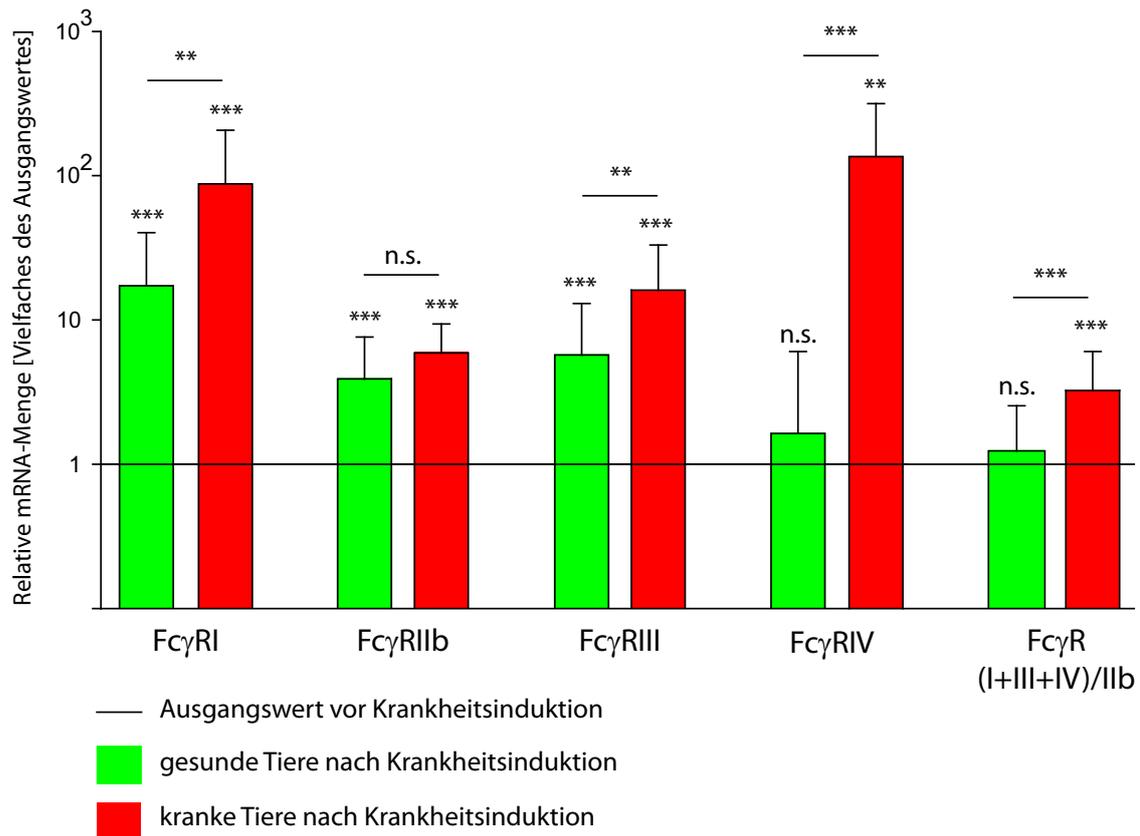


Fig. 3.9: **Expression von Fc γ -Rezeptoren vor und zehn Wochen nach Krankheitsinduktion in der Haut gesunder und kranker Tiere.** Dargestellt ist die Expression der Fc γ -Rezeptoren als Vielfaches des Ausgangswertes vor Krankheitsinduktion (durchgezogene Linie; Wert=1). Fc γ RI, IIb und III werden von kranken und gesunden Tieren stärker nach als vor Krankheitsinduktion exprimiert. Fc γ RIV wird ausschließlich von kranken Tieren vermehrt exprimiert. Der inhibitorische Fc γ RIIb zeigt keinen Unterschied in der Expression zwischen kranken und gesunden Tieren. Alle anderen Fc γ -Rezeptoren werden stärker von kranken als von gesunden Tieren exprimiert. Das Verhältnis von aktivierenden zu inhibierenden Rezeptoren steigt nur bei kranken Tieren nach EBA-Induktion an und ist größer als in gesunden Tieren. Logarithmische Darstellung; Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels WILCOXON Rang-Test und MANN-WHITNEY U-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (n=6-28).

MIP-1 α und TNF werden nur in der Haut kranker Tiere stärker als vor Krankheitsinduktion exprimiert.

Um zu untersuchen, welche chemotaktischen Botenstoffe zusammen mit der Komplement-Aktivierung die Auswanderung der neutrophilen Granulozyten unterstützen, habe ich die Chemokine und Zytokine IL-1 β , KC, IL-18, IL-33, MIP-1 α und TNF auf ihre Expression in der Haut untersucht. Die genannten Botenstoffe wirken stark chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten [2, 4, 9, 28, 70, 88, 103, 123]. Wird die Expression dieser Botenstoffe zwischen kranken und gesunden Tieren verglichen, zeigt sich, dass IL-1 β , KC, MIP-1 α und TNF von kranken Tieren stärker als von gesunden exprimiert werden. IL-18 und IL-33 zeigen

in kranken und gesunden Tieren keinen signifikanten Unterschied in der Expression. IL-1 β , KC, IL-18 und IL-33 weisen in allen Tieren nach eine stärkere Expression auf als vor der Krankheitsinduktion, was einen essentiellen Einfluss auf die Symptomentstehung unwahrscheinlich macht. Die sequentiell wirkenden MIP-1 α und TNF hingegen sind nur in kranken Tieren in der Haut hochreguliert; bei gesunden Tieren bleibt eine stärkere Expression nach Krankheitsinduktion aus (siehe Fig. 3.10).

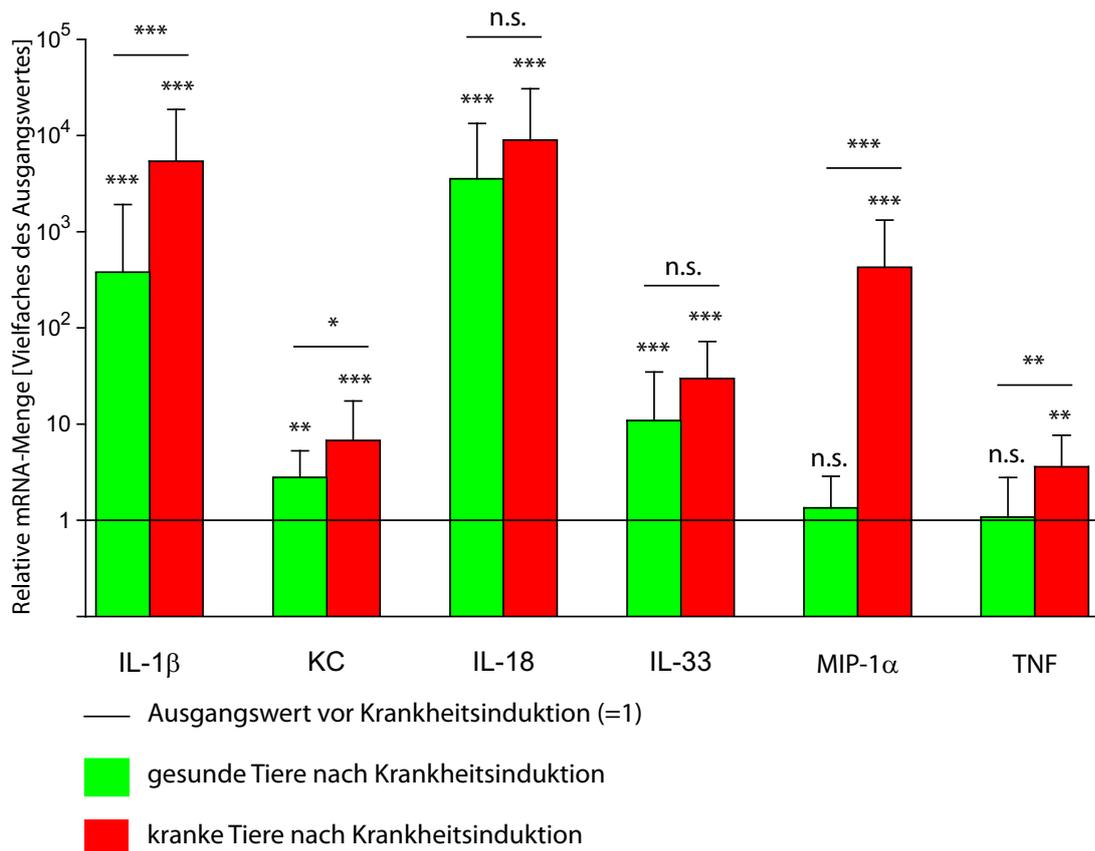


Fig. 3.10: **Expression von Zytokinen und Chemokinen, die die Migration neutrophiler Granulozyten fördern, 10 Wochen nach Krankheitsinduktion.** Dargestellt ist die Expression des jeweiligen Botenstoffes als Vielfaches des Ausgangswertes vor Krankheitsinduktion (durchgezogene Linie; Wert=1) IL1 β , KC, IL-18 und IL-33 werden nach Krankheitsinduktion von kranken und gesunden Tieren verstärkt exprimiert. Mit Ausnahme von IL-18 und IL-33 werden alle Mediatoren von kranken stärker als von gesunden Tieren exprimiert. MIP-1 α und TNF werden ausschließlich von kranken Tieren verstärkt exprimiert. Logarithmische Darstellung; Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels WILCOXON Rang-Test und MANN-WHITNEY U-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (n=6-28).

CD3 ϵ wird in der Haut kranker Tiere im Vergleich zu vor der Krankheitsinduktion vermindert exprimiert.

Neutrophile Granulozyten, MIP-1 α und TNF sind verglichen mit vor der Krankheitsinduktion ausschließlich in der Haut kranker Tiere vermehrt zu finden. Da neutrophile Granulozyten

durch MIP-1 α - und TNF-Produktion chemotaktisch auf andere Zellen und neutrophile Granulozyten wirken und so einen Entzündungsprozess perpetuieren können [15, 16, 27, 103], habe ich die Infiltration anderer Zelltypen in die Haut auf mRNA-Ebene mit den Zellmarkern CD3 ϵ , CD11c und MAC-1 quantifiziert (siehe Fig. 3.11). Hierbei fällt auf, dass CD3 ϵ ausschließlich in der Haut kranker Tiere vermindert exprimiert wird. Gesunde Tiere hingegen zeigen nach Krankheitsinduktion keine Veränderung in der Expression von CD3 ϵ in der Haut, so dass die Expression von CD3 ϵ 10 Wochen nach Krankheitsinduktion in gesunden stärker ist als in kranken Tieren. Die Expression von CD11c und MAC-1 ist sowohl bei gesunden als auch bei kranken Tieren nach der Krankheitsinduktion in der Haut gesteigert. Die Expression von MAC-1 ist nach der Krankheitsinduktion bei kranken Tieren im Vergleich zu gesunden jedoch höher.

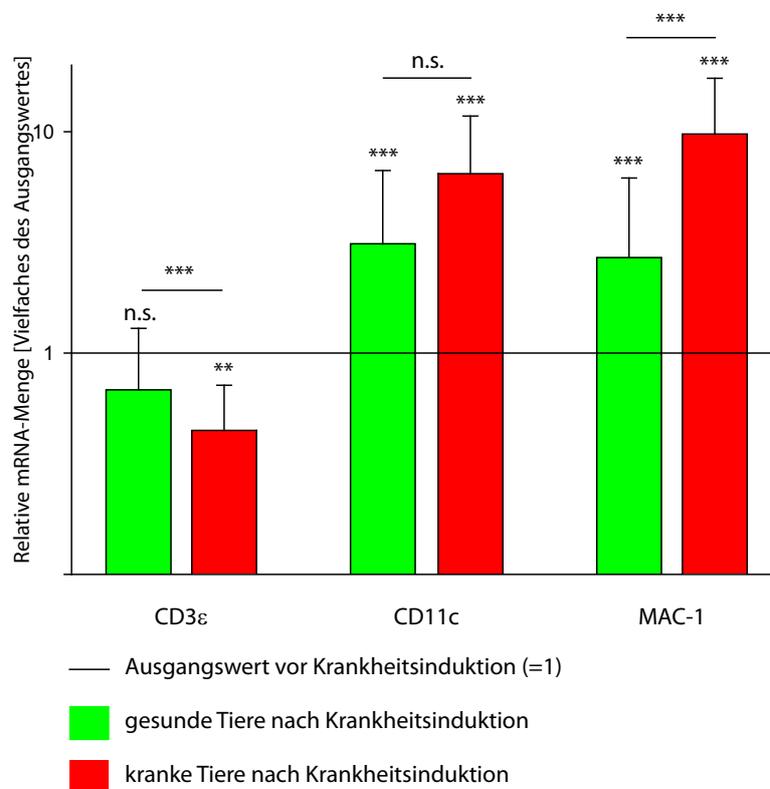


Fig. 3.11: **Expression von Oberflächenmarkern in der Haut 10 Wochen nach Krankheitsinduktion.** Dargestellt ist die Expression des jeweiligen Botenstoffes als Vielfaches des Ausgangswertes vor Krankheitsinduktion (durchgezogene Linie; Wert=1) CD3 ϵ wird nur in der Haut kranker Tiere vermindert exprimiert; gesunde Tiere zeigen keine Änderung in der CD3 ϵ -Expression. Logarithmische Darstellung; Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels WILCOXON Rang-Test und MANN-WHITNEY U-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (n=6-28).

Die Expression von Typ-VII-Kollagen zeigt in der Haut gesunder und kranker Tiere keinen Unterschied.

Typ-VII-Kollagen in der DEJ stellt das Antigen der EBA dar. Die Krankheitsinduktion führt bei erkrankenden Tieren zur stärkeren IgG2c-Ablagerung an der DEJ. Dies ist bei erkrankenden Tieren mit einer verstärkten Komplement-Aktivierung und einer Infiltration neutrophiler Granulozyten assoziiert. Die Infiltration neutrophiler Granulozyten ist wiederum mit einer erhöhten Expression von $Fc\gamma RIV$, TNF und $MIP-1\alpha$ und einer verminderten Expression von $CD3\epsilon$ vergesellschaftet. Aufgrund dieser vielfältigen und unterschiedlichen Veränderungen in der Haut kranker und gesunder Tiere nach Krankheitsinduktion habe ich die Expression des Antigens Typ-VII-Kollagen in der Haut kranker und gesunder Tiere verglichen. Es zeigt sich, dass sowohl bei kranken als auch gesunden Tieren die Expression von Typ-VII-Kollagen in der Haut nach der Krankheitsinduktion ansteigt. Dieser Anstieg ist bei kranken und gesunden Tieren nicht unterschiedlich (siehe Fig. 3.12).

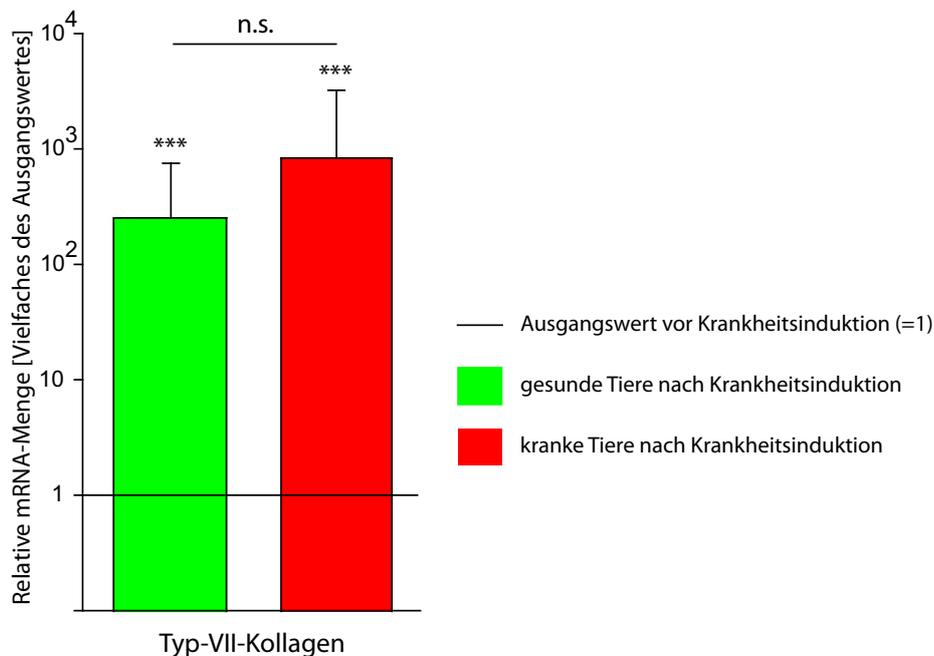


Fig. 3.12: **Expression von Typ-VII-Kollagen in der Haut 10 Wochen nach der Krankheitsinduktion in gesunden und kranken Tieren.** Dargestellt ist die Expression von Typ-VII-Kollagen als Vielfaches des Ausgangswertes vor Krankheitsinduktion (durchgezogene Linie; Wert=1). Gesunde und kranke Tiere zeigen im Vergleich zu vor der Krankheitsinduktion eine verstärkte Expression von Typ-VII-Kollagen. Kranke Tiere zeigen keine vermehrte Expression verglichen mit gesunden Tieren. Logarithmische Darstellung; Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels WILCOXON Rang-Test und MANN-WHITNEY U-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (n=6-28).

Zusammenfassung Ergebnisse 3.1:

- Die Entstehung von EBA-Symptomen ist mit einer größeren Zahl Typ-VII-Kollagen-spezifischer Plasmazellen im drainierenden Lymphknoten sowie einer größeren IgG2c-Konzentration im Blut und an der DEJ assoziiert.
- Die ebenfalls stärkere Komplement-Aktivierung in der Haut kranker Tiere hängt mit einer vermehrten Infiltration von neutrophilen Granulozyten und einer exklusiv in kranken Tieren erhöhten, kutanen Expression von Fc γ RIV, MIP-1 α und TNF zusammen.

3.2 Auswertung des drainierenden Lymphknotens nach Krankheitsinduktion vor Symptomentstehung oder -ausbleiben

Da trotz identischer genetischer Ausstattung und gleichen Umweltbedingungen erhebliche immunologische Unterschiede mit dem Auftreten bzw. Ausbleiben von EBA-Symptomen vergesellschaftet sind, habe ich den Ursprung dieser unterschiedlichen Immunantworten im drainierenden Lymphknoten betrachtet, um Erklärungsansätze für diese Unterschiede zu finden. Da der drainierende Lymphknoten nach der Krankheitsinduktion und vor der Symptomentstehung das Zentrum der pathogenen Prozesse darstellt, wurde er zwei Wochen nach der Krankheitsinduktion entfernt und auf unterschiedliche immunologische Prozesse untersucht.

Die Immunantwort gegen Typ-VII-Kollagen wird in den drainierenden Lymphknoten generiert.

Durch immunohistochemische Anfärbung von Plasmazellen, die gegen Typ-VII-Kollagen gerichtet sind, lässt sich die Antigen-Spezifität der Immunantwort nachweisen. Zwei Wochen nach der Krankheitsinduktion sind in den Sekundärfollikeln die Zentrozyten nachweisbar (siehe Fig. 3.13). Dass sich Keimzentren ausbilden, die spezifisch gegen Typ-VII-Kollagen gerichtet sind, zeigt die Th-Zell-Abhängigkeit der pathogenen Immunantwort. In der Medulla des Lymphknotens sind diese Plasmazellen nach zwei Wochen hingegen nur in geringer Zahl vorhanden. Hierbei zeigt sich kein Unterschied zwischen Tieren, die erkranken werden, und solchen, die gesund bleiben (Daten nicht gezeigt). Nach Auftreten der EBA-Symptome hingegen ist ein signifikanter Unterschied in der Zahl der Antigen-spezifischen Plasmazellen in der Medulla des drainierenden Lymphknotens nachzuweisen (siehe Fig. 3.5).

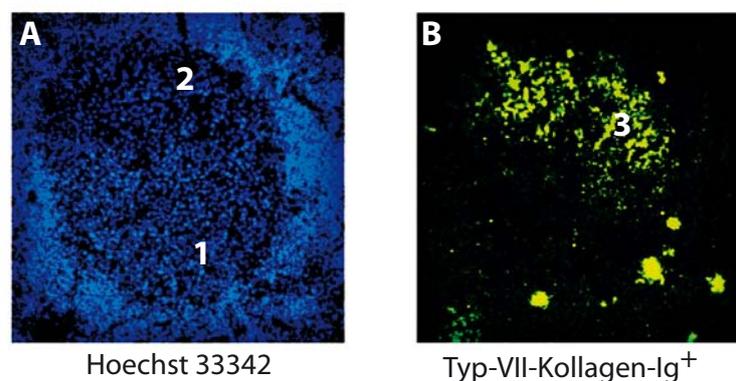


Fig. 3.13: Typ-VII-Kollagen-spezifisches Keimzentrum zwei Wochen nach Krankheitsinduktion. Es sind dunkle (1) und helle (2) Zonen in der Kernfärbung zu unterscheiden (A). In der hellen Zone lassen sich ausdifferenzierte Zentrozyten identifizieren (3, B), die spezifisch gegen Typ-VII-Kollagen gerichtet sind. Vergrößerung 400x.

Schon vor Ausbruch der Krankheitssymptome zeigen sich im poplitealen Lymphknoten Unterschiede zwischen erkrankenden und gesund bleibenden Tieren.

Durch die Quantifizierung von mRNA im exstirpierten poplitealen Lymphknoten lässt sich schon vor Beginn der EBA, nämlich nach 2 Wochen, die Immunantwort charakterisieren. Hierdurch gelingt der prospektive Vergleich von Tieren, die erkranken, und solchen, die gesund bleiben werden. Des Weiteren finden sich hierdurch Erklärungsansätze, die die unterschiedlichen Antikörper-Konzentrationen im Blut und in der Haut bei kranken und gesunden Tieren verstehen lassen. Die CD3-Expression ist stärker ausgeprägt im Gesamtlymphknoten der Tiere, die erkranken werden als bei solchen, die gesund bleiben. Vergleicht man bei diesen beiden Gruppen die Ratio der FoxP3- zur CD3-Expression, so ist dieser regulatorische Einfluss bei den gesund bleibenden Tieren höher als bei den erkrankenden (siehe Fig. 3.14). Der Vergleich der Th1- und Th2-assoziierten Zytokine in diesen beiden Gruppen zeigt im gesamten Lymphknoten keinen Unterschied der Expression. Hierbei werden IFN γ und IL12p40 zu den Th1-assoziierten Zytokinen gezählt, während IL4 und IL10 Th2-Zytokine darstellen (siehe Fig.3.15 und 3.16)

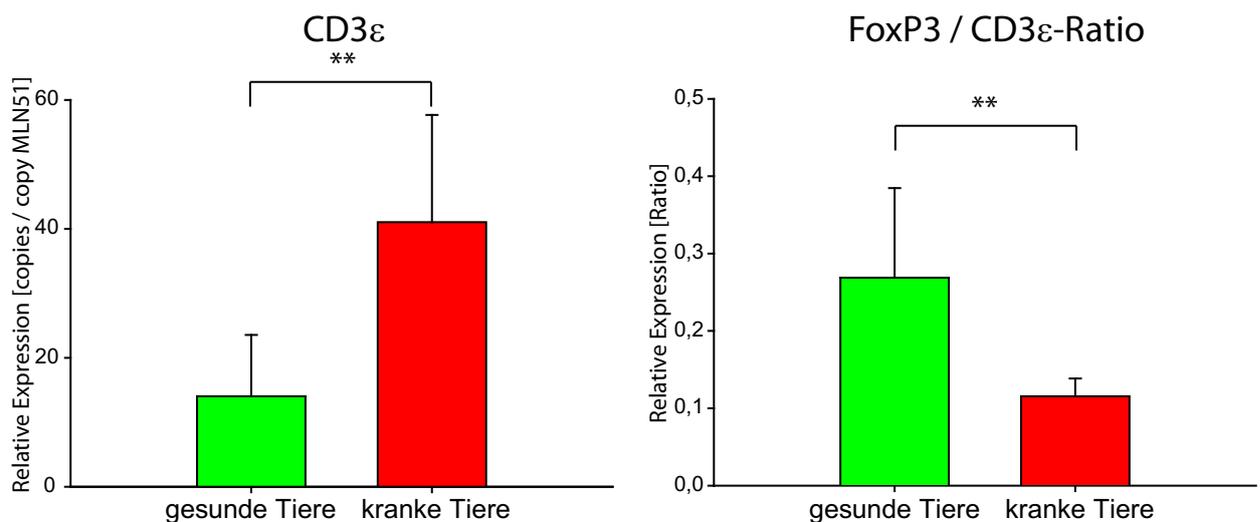


Fig. 3.14: **Expression von CD3 und Anteil der regulatorischen T-Zellen im Gesamtlymphknoten zwei Wochen nach Krankheitsinduktion.** Zu diesem Zeitpunkt sind alle Tiere gesund. Die Zuordnung krank und gesund erfolgt nach Verlaufsbeobachtung am Ende des Experiments. Kranke Tiere besitzen mehr T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten, bevor es zum Ausbruch von Symptomen kommt. Gesunde Tiere weisen einen höheren Anteil regulatorischer T-Zellen auf als kranke. Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Test; *p < 0,05; **p < 0,01; (je n=6).

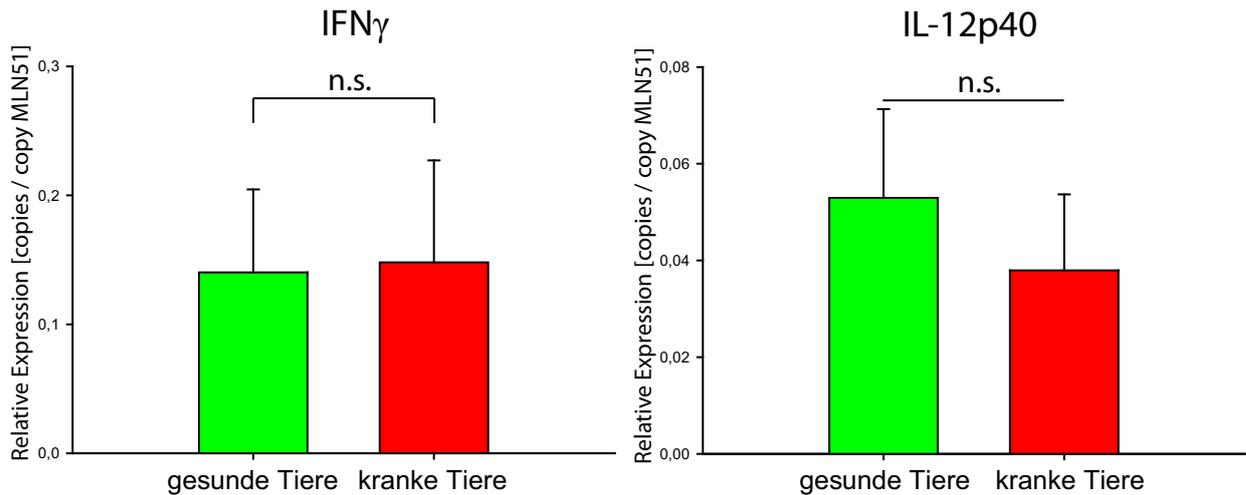


Fig. 3.15: **Expression der Th1-assoziierten Zytokine im Gesamlymphknoten zwei Wochen nach Krankheitsinduktion.** Zu diesem Zeitpunkt sind alle Tiere gesund. Die Zuordnung krank und gesund erfolgt nach Verlaufsbeobachtung am Ende des Experiments. Kranke und gesunde Tiere zeigen keinen Unterschied bezüglich der Expression von IFN γ und IL12p40. IL12p40 ist ebenfalls ein Bestandteil von IL23. Die Analyse von IL12p35 (IL12-spezifisch) im T-Zell-Kompartiment erbrachte ebenfalls keinen Unterschied. Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Tests; n.s. $p > 0,05$; (je $n=6$).

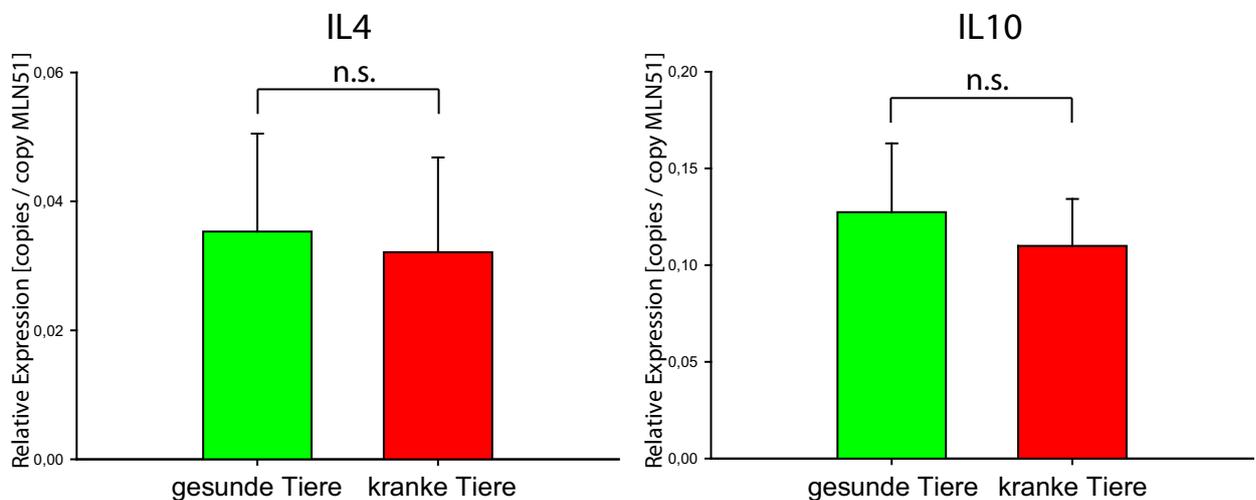


Fig. 3.16: **Expression der Th2-assoziierten Zytokine im Gesamlymphknoten zwei Wochen nach Krankheitsinduktion.** Zu diesem Zeitpunkt sind alle Tiere gesund. Die Zuordnung krank und gesund erfolgt nach Verlaufsbeobachtung am Ende des Experiments. Kranke und gesunde Tiere zeigen keinen Unterschied bezüglich der Expression von IL4 und IL10. Die Analyse von IL4 und IL10 im T-Zell-Kompartiment erbrachte ebenfalls keinen Unterschied. Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Test; n.s. $p > 0,05$; (je $n=6$).

Diese Unterschiede charakterisieren die Immunantwort im gesamten Lymphknoten. Mit der Betrachtung der einzelnen Kompartimente des poplitealen Lymphknotens (T-Zone, B-Zone

und Keimzentrum) nach zwei Wochen lassen sich spezifische Zell-Populationen in ihrer Zytokin-Expression beschreiben. Für die T-Zone ist reproduzierbar, dass die Expression der Th1- und Th2-assoziierten Zytokine sich nach zwei Wochen nicht unterscheidet. Alle weiteren untersuchten Zytokine, die für eine unterschiedliche Ausrichtung der T-Zell-Antwort (Th1, Th2, Th17) bei kranken und gesunden Tieren sprechen können, zeigen im gesamten Lymphknoten und in der T-Zone keinen signifikanten Unterschied (siehe Tabelle 7). Gleiches gilt für die immunhistochemisch nachgewiesene Proliferation in der T-Zone, die nach 2 Wochen keinen Unterschied aufweist (Daten nicht gezeigt).

Tab. 7: Immunologische Parameter, die im gesamten Lymphknoten, T-Zell Zone, B-Zell Zone und Keimzentrum 2 Wochen nach Krankheitsinduktion quantifiziert werden.*

Zellmarker	Transkriptions-faktoren	Rezeptoren	Zytokine Chemokine
CD3 CD19 CD11c CD69 GR-1 Mac-1	RGS16 FoxP3 RoR γ t	Fc γ RI Fc γ RII Fc γ RIII Fc γ RIV CXCR5	CXCL13 BAFF IL2 IL4 IL6 IL10 IL12p35 IL12p40 IL17 IL21 IL27 IFN γ LT β TGF β TNF

*In **rot** hervorgehoben sind die Parameter, die signifikante Unterschiede zwischen erkrankenden und gesund bleibenden Tieren zeigen. Die Auswahl erfolgt entsprechend dem aktuellen Stand der Wissenschaft, der in Kapitel 1.2 erläutert wurde. Zusätzlich wird die Expression des Enzyms Activation Induced Cytidin Deaminase (AID) bestimmt.

Bei Untersuchung der mRNA-Expression von Zytokinen in der B-Zell-Zone im poplitealen Lymphknoten zwei Wochen nach Krankheitsinduktion zeigt sich eine signifikant höhere Expression von TNF bei denjenigen Tieren, die erkranken werden im Vergleich zu den gesund bleibenden. Der Vergleich aller weiteren untersuchten Zytokine in der B-Zell Zone zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen (siehe Tabelle 7).

Um die Generierung der Autoantikörper kausal zu untersuchen, habe ich eine Expressionsanalyse in den Keimzentren durchgeführt. Die Expression von Activation Induced Cytidin Deaminase (AID) der Zentrozyten und Zentroblasten ist bei erkrankenden Tieren geringer als bei gesunden Tieren (siehe Fig. 3.17). Alle weiteren untersuchten Zytokine, Transkriptionsfaktoren und Zellmarker unterscheiden sich bei erkrankenden und gesund bleibenden Tieren nicht (siehe Tab. 7). Als direkte Auswirkung der Transkription von AID kann man die Größe der Keimzentren bei erkrankenden und gesund bleibenden Tieren vergleichen. Hierbei zeigt sich zwischen der durchschnittlichen Keimzentrumsgröße bei erkrankenden und gesund bleibenden Tieren kein Unterschied nach 2 Wochen. Ebenso ist die Größe der T- und der B-Zone zwischen diesen beiden Gruppen nach 2 Wochen nicht unterschiedlich (Daten nicht gezeigt).

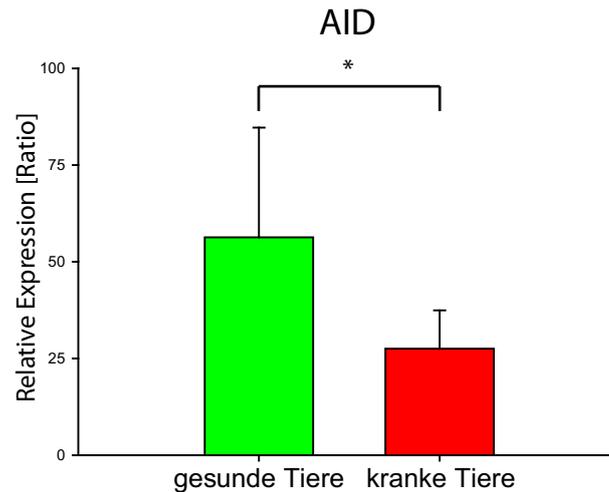


Fig. 3.17: **Verhältnis der Expression von AID in Keimzentren verglichen mit der B-Zone zwei Wochen nach Krankheitsinduktion.** Die Zentrozyten und Zentroblasten kranker und gesunder Tiere exprimieren vermehrt AID verglichen mit den Zellen der B-Zell-Zone (Ratio > 1). Das Enzym AID ist für die somatische Hypermutation und die Affinitätsreifung der B-Zellen im Keimzentrum verantwortlich. Eine erhöhte Expression ist gleichfalls ein Apoptose-Signal. B-Zellen in Keimzentren gesunder Tiere exprimieren AID verglichen mit Zellen der B-Zone stärker als Keimzentrumzellen kranker Tiere. Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Test, *p < 0,05; (je n=6).

Zusammenfassung Ergebnisse 3.2:

- Eine stärkere Expression von CD3 und ein geringeres Verhältnis der FoxP3/CD3-Expression lässt sich im drainierenden Lymphknoten der später erkrankenden verglichen mit gesund bleibenden Tieren zwei Wochen nach Krankheitsinduktion (also vor Ausbruch von Krankheitssymptomen) nachweisen.
- Die Expression Th1-, Th2- oder Th17-assoziiierter Zytokine zeigt zwei Wochen nach der Krankheitsinduktion (also vor Ausbruch von Krankheitssymptomen) im drainierenden Lymphknoten keinen Unterschied zwischen später erkrankenden und gesund bleibenden Tieren.

3.3 Auswertung von immunologischen Parametern im Blut und in der Haut vor Krankheitsinduktion

Bereits vor EBA-Induktion zeigen sich Unterschiede im Blut zwischen Tieren, die erkranken werden, und Tieren, die gesund bleiben.

Nach Beschreibung der Entstehung von Krankheitssymptomen und der Analyse der Immunantwort im drainierenden Lymphknoten habe ich nun untersucht, ob schon *vor* der Krankheitsinduktion Unterschiede zwischen den Tieren bestehen und ob sich diese Unterschiede auf den Krankheitsverlauf auswirken. Zunächst habe ich systemische Unterschiede untersucht, die grob Aufschluss über den Zustand des Immunsystems geben. Zu diesem Zweck wurde den Tieren bereits vor der Krankheitsinduktion Blut entnommen. Es zeigt sich, dass die Tiere, die erkranken werden, im Gegensatz zu den gesund bleibenden Tieren eine erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 im Blut aufweisen (siehe Fig. 3.18). Die Zahl der CD69-positiven Zellen bzw. die Expression dieses Markers pro Zelle ist folglich bei den erkrankenden Tieren schon vor Intervention durch die Krankheitsinduktion erhöht. Aus der Vielzahl der untersuchten Zellmarker und Zytokine (siehe Tabelle 8) zeigte sich sonst kein Unterschied, der mit dem Krankheitsverlauf korrelierte.

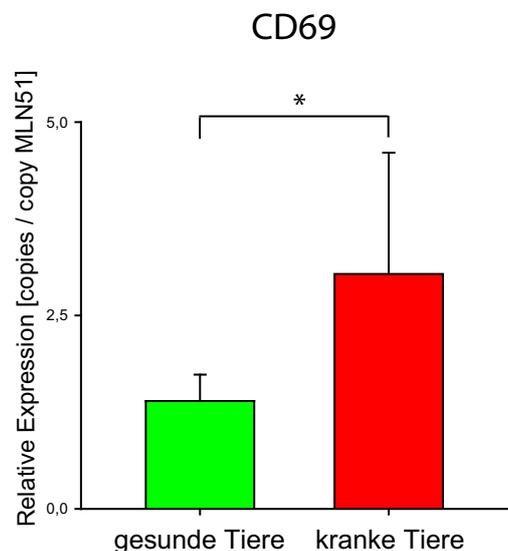


Fig. 3.18: **Expression von CD69 in peripheren Blutzellen eine Woche vor Krankheitsinduktion.** Zu diesem Zeitpunkt sind alle Tiere gesund. Die Zuordnung krank und gesund erfolgt nach Verlaufsbeobachtung am Ende des Experiments. Tiere, die erkranken werden, zeigen bereits vor Krankheitsinduktion eine höhere Expression von CD69 als Tiere, die gesund bleiben werden. Die nachgewiesene mRNA kann keiner Zellpopulation nachgewiesen werden. Nach Krankheitsinduktion ist der Unterschied nicht mehr nachweisbar; die Expression liegt vor und nach Krankheitsinduktion in der gleichen Größenordnung (Daten nicht gezeigt). Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Test; * $p < 0,05$; (je $n=6$).

Tab. 8: Immunologische Parameter, die in peripheren Blutzellen 1 Woche vor sowie repetitiv nach Krankheitsinduktion quantifiziert werden.*

Zellmarker	Rezeptoren	Zytokine Chemokine
CD3 CD19 CD11c CD69 GR-1 Mac-1	Fc γ RI Fc γ RII Fc γ RIII Fc γ RIV C5aR	IL1 β IL4 IL6 IL17 IL18 IL21 IL27 IL33 MIP-1 α

*In **rot** hervorgehoben sind die Parameter, die signifikante Unterschiede zwischen erkrankenden und gesund bleibenden Tieren zeigen. Die Auswahl erfolgt entsprechend dem aktuellen Stand der Wissenschaft, der in Kapitel 1.2 erläutert wurde.

Bereits vor EBA-Induktion lassen sich Unterschiede in der Haut identifizieren, die anzeigen, ob ein Tier krank wird oder gesund bleibt.

Vor der Krankheitsinduktion werden den Tieren Hautproben entnommen, um zu untersuchen, ob nicht nur systemisch, sondern auch in der Haut, dem Zielorgan der EBA, bereits Unterschiede bestehen, die mit dem späteren Krankheitsverlauf korrelieren. Diese Unterschiede können als Erklärungsansatz für den unterschiedlichen Krankheitsverlauf dienen. Das Intervall von Probenentnahme an der Haut bis zur Krankheitsinduktion wird mit einer Woche so gewählt, dass die Biopsiewunden zum Zeitpunkt der Krankheitsinduktion nahezu verheilt sind.

Ich habe die mRNA-Expression verschiedener Gene in der Haut vor der Krankheitsinduktion quantifiziert. Tiere, die im späteren Verlauf erkranken werden, zeigen eine stärkere Expression von TNF, KC und CD11c in der Haut vor Krankheitsinduktion (siehe Fig. 3.19). Es konnte für die 19 weiteren untersuchten Gene kein Unterschied in ihrer Expression vor der Krankheitsinduktion in der Haut gefunden werden (siehe Tabelle 9).

Tab. 9: Immunologische Parameter, die in der Haut 1 Woche vor Krankheitsinduktion quantifiziert werden.*

Zellmarker	Rezeptoren	Zytokine Chemokine
CD3 CD19 CD11c GR-1 Mac-1	Fc γ RI Fc γ RII Fc γ RIII Fc γ RIV C5aR	TNF IFN γ IL1 β IL3 IL4 IL9 Il10 IL18 IL33 KC MIP-1 α RANTES

*In **rot** hervorgehoben sind die Parameter, die signifikante Unterschiede zwischen erkrankenden und gesund bleibenden Tieren zeigen. Die Auswahl erfolgt entsprechend dem aktuellen Stand der Wissenschaft, der in Kapitel 1.2 erläutert wurde.

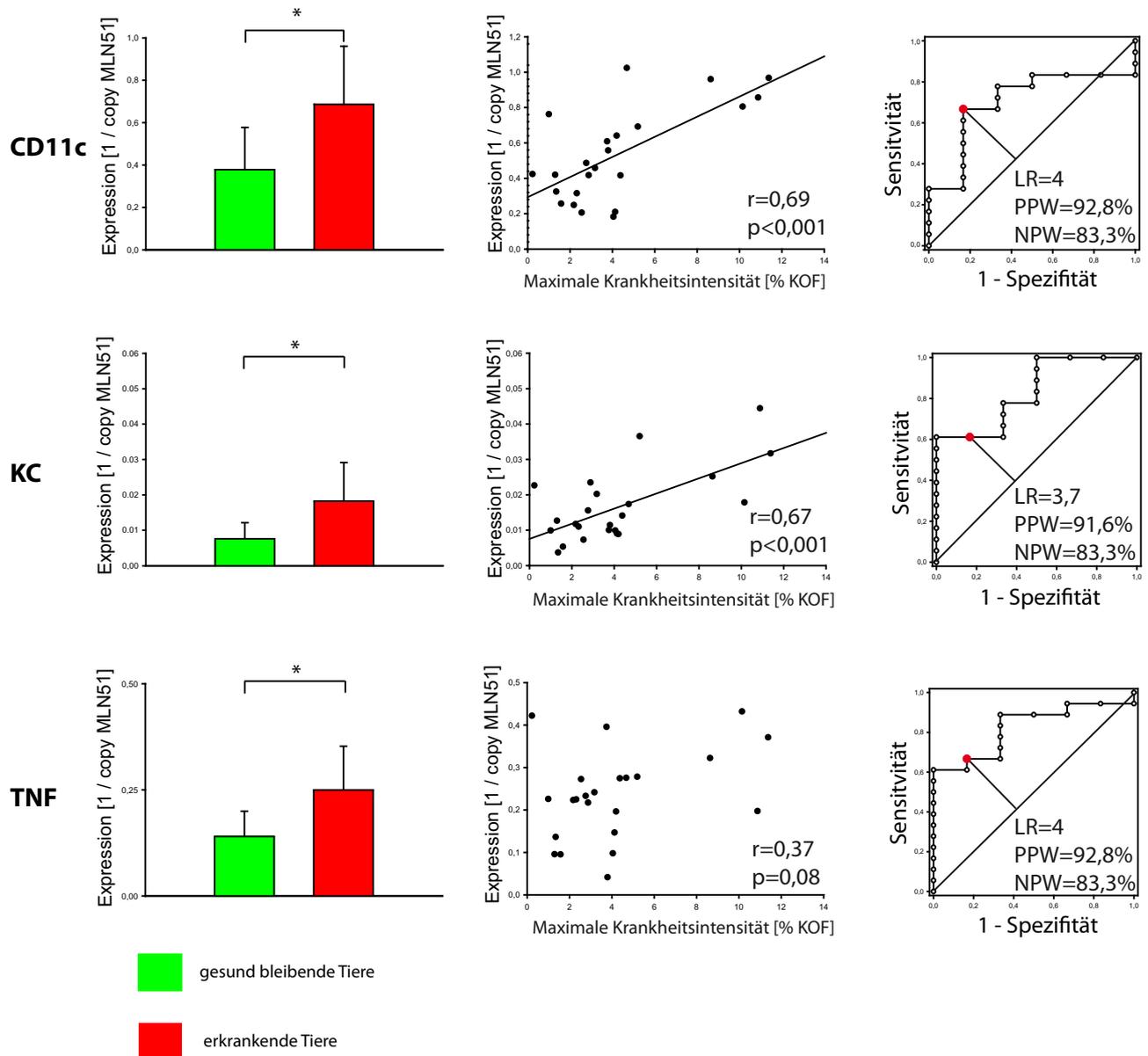


Fig. 3.19: **Zytokine und Zellmarker in Hautbiopsien vor Induktion der experimentellen EBA.** Zum Zeitpunkt der Biopsie sind alle Tiere klinisch gesund. Tiere, die nach der Krankheitsinduktion EBA-Symptome entwickeln werden, zeigen bereits vor der Krankheitsinduktion eine erhöhte Expression der proinflammatorischen Zytokine KC und TNF und des Zellmarkers CD11c (linke Spalte). Es zeigt sich eine positive Korrelation zwischen Expression und betroffener Körperoberfläche für CD11c ($r=0,69$; $p<0,001$) und KC ($r=0,67$; $p<0,001$). Aus der Expression und dem klinischen Endpunkt kann mittels ROC-Analyse ein Schwellenwert für die einzelnen Parameter berechnet werden (rechte Spalte). Dieser Schwellenwert dient zur Berechnung der Likelihood Ratio (LR) und des positiv sowie negativ prädiktiven Wertes (PPW, NPW). Der PPW beträgt für alle dargestellten Gene $>90\%$ für Ergebnis "krank", der NPW $>80\%$. (Darstellung als Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Test; $*p < 0,05$; (je $n=6-18$); PEARSON-Produkt-Moment Korrelation, lineare Darstellung; $n=23$; ROC-Kurven-Analyse)

Des Weiteren habe ich die vor der Krankheitsinduktion erhobene Zytokin-Expression mit dem Schweregrad der Krankheit (gemessen als betroffene Körperoberfläche in %) korreliert, um graduelle Vorhersagen über den Krankheitsverlauf treffen zu können. Hierbei zeigt sich, dass die Expression von CD11c in der Haut vor der Krankheitsinduktion eng mit dem zu erwartenden Schweregrad der EBA korreliert ($r=0,69$). Ähnlich eng ist die Korrelation zwischen KC und dem zu erwartenden Schweregrad der EBA ($r=0,67$). Hierdurch lässt sich schon vor der Krankheitsinduktion sagen, wie krank ein Versuchstier werden wird. Für TNF hingegen kann keine Korrelation zwischen der Expression vor der Krankheitsinduktion und dem später erreichten Krankheitszustand gefunden werden ($r=0,37$; $p=0,08$). Für die weiteren untersuchten Gene konnte ebenfalls keine Korrelation mit dem klinischen Endpunkt festgestellt werden.

Aus der dichotomen Unterscheidung zwischen später erkrankenden und gesund bleibenden Tieren kann mittels ROC-Kurven-Analyse ein Schwellenwert für die Expression jedes Parameters berechnet werden. Die Anwendung des ermittelten Schwellenwertes auf die beobachtete Population ermöglicht die Berechnung eines positiv prädiktiven Wertes. Dieser sagt die Wahrscheinlichkeit voraus, mit der bei Überschreiten des Schwellenwertes ein Tier erkranken wird. Für die Expression von CD11c und TNF ergibt sich ein positiv prädiktiver Wert von 92,8% zu erkranken. Für die Expression von KC beträgt die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten der Krankheit 91,6%, wenn der definierte Schwellenwert überschritten ist. Der negativ prädiktive Wert aller drei Parameter beträgt 83,3% und gibt die Wahrscheinlichkeit an, gesund zu bleiben, falls dieser Schwellenwert unterschritten wird.

Zusammenfassung Ergebnisse 3.3:

- Bereits vor der Krankheitsinduktion zeigen Tiere, die später erkranken werden, eine stärkere Expression von CD69 im Blut sowie von CD11c, KC und TNF in der Haut als Tiere, die gesund bleiben werden.
- Die Expression von CD11c, KC und TNF in der Haut kann die Entstehung von EBA-Symptomen bereits vor der Krankheitsinduktion mit >90% vorhersagen und mit >80% ausschließen.

4 Diskussion

4.1 EBA-Symptome werden durch eine verstärkte Produktion und Bindung von Typ-VII-Kollagen-spezifischem IgG2c sowie einer neutrophilen Entzündung verursacht.

Die vorliegende Arbeit vergleicht die immunologischen Unterschiede, die vor und nach EBA-Induktion mit Typ-VII-Kollagen und dem Adjuvans Titermax bei genetisch identischen SJL-Mäusen unter möglichst gleichen Umweltbedingungen auftreten. Unterscheidungskriterium zwischen den Tieren ist hierbei der Ausbruch oder das Ausbleiben von EBA-Symptomen. Die Symptomentstehung soll deshalb im Folgenden als erstes diskutiert werden.

10 Wochen nach Krankheitsinduktion lassen sich in den drainierenden, poplitealen Lymphknoten der kranken Tiere eine erhöhte Zahl Typ-VII-Kollagen-spezifischer Plasmazellen nachweisen. Als Konsequenz dieses Unterschieds zeigen kranke Tiere eine erhöhte Konzentration Typ-VII-Kollagen-spezifischer IgG2c-Antikörper im Blut. IgG2c ist in verschiedenen Tiermodellen entzündlicher sowie autoimmuner Krankheiten als in höchstem Maß pathogen beschrieben worden [13, 30, 33, 98]. Um zu untersuchen, ob der im Blut nachgewiesene Unterschied auch am Manifestationsort der EBA, der DEJ in der Haut, relevant ist, habe ich die am Typ-VII-Kollagen gebundenen Antikörper mittels DIF zwischen kranken und gesunden Tieren verglichen. Es zeigt sich, dass der im Blut gefundene Unterschied auch in der Haut nachgewiesen werden kann, und kranke Tiere mehr IgG2c als gesunde an der DEJ aufweisen. Dass der Unterschied in der Haut durch unterschiedliche Affinität der Antikörper verursacht wird, ist weniger wahrscheinlich. Erstens kann eine unterschiedliche IgG2c-Konzentration auch im Blut nachgewiesen werden. Zweitens zeigen kranke Tiere keine verstärkte Affinitätsreifung im drainierenden Lymphknoten.

Da IgG2c-Antikörper Komplement-aktivierend sind [41, 42], und weil das Komplementsystem in der Pathogenese der EBA als essentiell beschrieben ist [87], habe ich die Ablagerung des Komplementfaktors C3 an der DEJ zwischen erkrankten und gesunden Tieren verglichen. Hierbei zeigen kranke Tiere eine stärkere Deposition von C3 an der DEJ. Als Konsequenz der Komplement-Aktivierung ist mit der Infiltration von Entzündungszellen zu rechnen. In der vorliegenden Arbeit habe ich die Zahl der neutrophilen Granulozyten mittels GR-1-mRNA-Nachweis und Quantifizierung von GR-1⁺ Zellen verglichen. Da GR-1 ebenso von eosinophilen Granulozyten exprimiert wird [37], wurde zusätzlich ein funktioneller Nachweis der neutrophilen Granulozyten mittels MPO-Assay durchgeführt. Kranke Tiere zeigen in allen Nachweismethoden eine höhere Zahl neutrophiler Granulozyten in der Haut als gesunde. Zusätzlich zeigen gesunde Tiere keine relevante Infiltration neutrophiler Granulozyten. Somit ist die Infiltration neutrophiler Granulozyten bei gleicher genetischer Ausstattung und identischen Umweltbedingungen als essentiell für die Krankheitsentstehung zu sehen. Für die EBA ist in der humanen Variante *in vitro* die Rolle der neutrophilen Granulozyten in der Pathogenese beschrieben worden [105, 118]. Im vorliegenden Tier-Modell der EBA wur-

de der inflammatorische Charakter der Krankheit zwar nachgewiesen [116], bislang jedoch nicht quantifiziert und mit der unterschiedlichen Empfänglichkeit bei genetischer Gleichheit in Beziehung gesetzt.

Zusätzlich zur Quantifizierung der neutrophilen Granulozyten vergleicht die vorliegende Arbeit das Fc γ -Rezeptor-Repertoire in der Haut kranker und gesunder Tiere. Fc γ RIV ist der einzige Fc γ -Rezeptor-Subtyp, der ausschließlich von kranken Tieren stärker nach als vor der Krankheitsinduktion exprimiert wird. Alle anderen Fc γ -Rezeptoren werden auch in der Haut gesunder Tiere stärker nach der Induktion der EBA exprimiert. Das Auftreten von EBA-Symptomen ist an die vermehrte Expression von Fc γ RIV gekoppelt, so dass diesem Rezeptor eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der EBA zuzuschreiben ist. Die aktivierenden Fc γ RI, III und IV werden in der Haut kranker stärker exprimiert als in der Haut gesunder Tiere, während der einzige inhibierende Rezeptor Fc γ RIIb in der Haut kranker und gesunder Tiere in gleichem Maße exprimiert wird. Da diese Rezeptoren vornehmlich der größten Zellpopulation in inflammatorischen Infiltraten, den neutrophilen Granulozyten [128], zuzuschreiben sind, kann deren Aktivierungsgrad anhand der Menge der aktivierenden Rezeptoren Fc γ RI, III und IV im Vergleich zum inhibierenden Rezeptor Fc γ RIIb beschrieben werden [21, 104]. Die vorliegenden Daten zeigen, dass die neutrophilen Granulozyten in der Haut kranker Tiere nicht nur quantitativ vermehrt sind, sondern auch qualitativ einen erhöhten Aktivierungsstatus aufweisen, da die Ratio aktivierender zu inhibierenden Fc γ -Rezeptoren bei kranken Tieren größer ist. Die Entstehung von EBA-Symptomen ist also zusätzlich zur bekannten Einwanderung von neutrophilen Granulozyten auch an deren hier beschriebenen Phänotyp gekoppelt.

Die Kombination von IgG2c-Antikörpern und einer vermehrten Expression von Fc γ RIV, die für die Symptomentstehung im vorliegenden Modell verantwortlich ist, wurde bereits als hoch potent proinflammatorisch beschrieben [96, 97, 98]. Die Affinität der einzelnen IgG-Subklassen zu den Fc γ R ist unterschiedlich [98]. Für IgG2c beträgt die Ratio der Affinität von aktivierenden zu inhibierenden Fc γ -Rezeptoren 70 und ist somit am größten unter allen IgG-Subklassen. Dies unterstreicht die pathogenetische Relevanz dieser Kombination aus Antikörper und Rezeptor, die an die Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten geknüpft ist.

Der erhöhte Aktivierungsgrad neutrophiler Granulozyten in der Haut kranker Tiere ist mit einer erhöhten Expression von chemotaktischen Botenstoffen assoziiert. IL-1 β , KC, MIP-1 α und TNF werden in der Haut kranker stärker exprimiert als in der Haut gesunder Tiere. MIP-1 α und TNF sind exklusiv in der Haut kranker Tiere stärker als vor der Krankheitsinduktion exprimiert. Da neutrophile Granulozyten als einziger Zelltyp ausschließlich in der Haut kranker und nicht in der Haut gesunder Tiere zu finden sind, sind sie als Produzenten von MIP-1 α und TNF anzunehmen. Die Expression von MIP-1 α und TNF wirkt chemotaktisch auf andere Zellen sowie wiederum auf neutrophile Granulozyten [15, 16, 24, 27, 103] und könnte im vorliegenden Modell auf eine perpetuierende Rolle dieser beiden Botenstoffe hinweisen. IL18 und IL33 können ebenfalls die Infiltration von neutrophilen Granulozyten

in verschiedene Gewebe fördern [4, 78, 79, 124], zeigen im vorliegenden Modell allerdings keinen Unterschied zwischen kranken und gesunden Tieren.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass in der vorliegenden Arbeit trotz identischer Genetik und gleichen Umweltbedingungen in der Haut kranker und gesunder Mäuse nach Krankheitsinduktion erhebliche immunologische Unterschiede zu finden sind. IgG2c wird von kranken Mäusen vermehrt produziert und aktiviert das Komplement-System; dies führt durch chemotaktische Signale zur Infiltration von aktivierten, neutrophilen Granulozyten, welche den Entzündungsprozess unterhalten. Da diese Unterschiede trotz größt möglicher Gleichheit der Versuchstiere auftreten, stellt sich die Frage, wodurch diese Unterschiede ursächlich bedingt sind. Aus diesem Grund soll im Folgenden die für die unterschiedliche B-Zell-Aktivierung und Antikörper-Produktion verantwortliche T-Zell-Immunantwort diskutiert werden.

4.2 Die Entstehung von EBA-Symptomen ist nicht mit einer spezifischen Gewichtung der Th-Zell-abhängigen Immunantwort assoziiert.

Die im vorherigen Abschnitt genannten Unterschiede in der Zahl der Typ-VII-Kollagen-spezifischen Plasmazellen und IgG2c-Antikörper können durch eine unterschiedliche Gewichtung der Th-Zell-abhängigen Immunantwort in der Frühphase nach der Krankheitsinduktion verursacht sein [30, 91, 98], was im Folgenden diskutiert werden soll.

Zwei Wochen nach Induktion der experimentellen EBA ist die Expression von CD3 ϵ im krankheitsinduzierenden Lymphknoten bei den Tieren, die erkranken werden, deutlich größer als bei den Tieren, die gesund bleiben werden. Interpretiert man die Expression von CD3 ϵ als Maß für die Anzahl der T-Zellen, besteht demnach in dem drainierenden Lymphknoten erkrankender Tiere ein größeres Potenzial, eine autoreaktive Immunantwort zu generieren. Dies ist konform mit der Erkenntnis, dass T-Zellen essentiell für die Entstehung der EBA in diesem aktiv immunisierenden Modell sind [115]. Zusätzlich zur erhöhten Zahl an T-Zellen im Lymphknoten ist bei erkrankenden Tieren die Expression von FoxP3 pro CD3 ϵ geringer als bei Tieren, die gesund bleiben werden. FoxP3 ist der essentielle Transkriptionsfaktor für regulatorische T-Zellen [60]. Durch den erhöhten regulatorischen Charakter der Immunantwort bei gesund bleibenden Tieren ist eine verminderte inflammatorische Reaktion gegen Typ-VII-Kollagen im weiteren Verlauf zu erklären. Hierdurch kann das Ausbleiben von Krankheitssymptomen hinreichend erläutert werden.

Neben der Quantifizierung von T-Zell-Populationen mittels Transkriptionsfaktoren oder Oberflächenmolekülen ist auch die funktionelle Aktivität dieser Zellen von Interesse. Diese kann durch die Quantifizierung der Expression der Th-spezifischen Zytokine charakterisiert werden. Mit Blick auf den Gesamtlymphknoten sowie auf das T-Zell-Kompartiment fällt nach 2 Wochen auf, dass kein Unterschied in der Expression Th1- und Th2-spezifischer Zytokine zwischen erkrankenden und gesund bleibenden Tieren festzustellen ist. Es kann somit

keine pathogene Immunreaktion klassifiziert werden, die den Krankheitsverlauf vorhersagen könnte. Auch Th17-Zytokine werden von allen Tieren unabhängig vom Krankheitsverlauf in identischer Quantität exprimiert.

Die Quantifizierung von CD3 und FoxP3 im Lymphknoten nach 2 Wochen und ein Überwiegen der regulatorischen T-Zellen steht im Zusammenhang mit dem Ausbleiben von Krankheitssymptomen. Dennoch lässt sich in der vorliegenden Arbeit kein funktioneller Unterschied der T-Zellen bei erkrankenden und gesund bleibenden Tieren identifizieren. Als Erklärung für die identische Zytokin-Expression bei allen SJL-Mäusen lässt sich die Methodik dieses Tiermodells anführen. Die Krankheitsinduktion erfolgt mit einem Fragment des murinen Typ-VII-Kollagens gemeinsam mit dem Adjuvans Titermax. Titermax bindet Protein-Antigene, Komplement und andere proinflammatorische Mediatoren [14]. Das Adjuvans-Konzept geht davon aus, dass durch eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems die Regulation der präexistenten autoreaktiven Immunzellen unterdrückt wird [66]. Durch die gleichzeitige Konfrontation der autoreaktiven Immunzellen mit dem Autoantigen kommt es zu einer pathogenen Immunantwort. Th-Zellen wird hierbei eine entscheidende Rolle zugeschrieben [115]. Es kommt bei Einsatz dieses Adjuvans' zu einer verstärkten Aktivierung des Immunsystems und zu lang anhaltenden hohen Konzentrationen von Antikörpern gegen das jeweilige Antigen [56]. Für Titermax konnte gezeigt werden, dass es Antigen-spezifisch zur Produktion von Antikörpern führt und dass die alleinige Gabe von Titermax ohne Antigen zu keiner verstärkten Antikörper-Produktion führt [57, 77].

Titermax verursacht im Vergleich zu anderen Adjuvantien eine verstärkte Th1- Immunantwort [35]. Diese Immunantwort ist jedoch nicht Antigen-spezifisch. Die Krankheitsinduktion mit Titermax ohne Antigen führt zu einer ubiquitären Aktivierung des Immunsystems. Diese äußert sich in einer verstärkten Expression von Zytokinen. Die Zytokin-Expression unterscheidet sich nicht beim Vergleich einer Krankheitsinduktion mit Titermax gemeinsam mit einem Peptid-Antigen oder mit Titermax allein [77]. Da im vorliegenden Modell durch Titermax eine generalisierte Aktivierung des Immunsystems erreicht wird, kann der pathogenetisch relevante Anteil der Immunreaktion in diesem "immunologischen Rauschen" nicht detektiert werden. Die Quantifizierung der Zytokin-Expression in einem Adjuvans-haltigen System scheint deshalb unspezifisch und nicht zielführend zu sein. Aus diesem Grund erscheinen Untersuchungen in einem Adjuvans-freien Modell, das bereits für das bullöse Pemphigoid etabliert werden konnte, effektiv [99, 122]. Hierdurch kann die pathogenetisch relevante Immunreaktion anhand der Zytokin-Expression eindeutig klassifiziert werden.

Da sich bei den untersuchten Zytokinen kein Unterschied zwischen erkrankenden und gesund bleibenden Tieren erkennen lässt, kann ein methodischer Fehler (unterschiedliche Menge an Injektionslösung) ausgeschlossen werden. Dass kein Th-Zell-abhängiger Unterschied zu verzeichnen ist, kann auch dadurch erklärt werden, dass die pathogenetisch relevante Zytokin-Expression zu einem anderen Zeitpunkt abläuft. Dies mag erklären, warum auch 10 Wochen nach der Krankheitsinduktion kein Unterschied in der Expression von Th-Zell-assoziierten Zytokinen (mit Ausnahme von IL21) zu finden ist.

Dass im Lymphknoten trotzdem entscheidende Vorgänge zur Entstehung der EBA ablaufen, lässt sich daran nachvollziehen, dass nach Krankheitsinduktion Typ-VII-Kollagen-spezifische Keimzentren zu identifizieren und Unterschiede in der Zahl der Typ-VII-Kollagen-spezifischen Plasmazellen zwischen kranken und gesunden Tieren nachzuweisen sind. Der Unterschied ihrer Anzahl im drainierenden Lymphknoten erklärt den unterschiedlichen Verlauf nach Krankheitsinduktion und ist konform zu den im Blut erhobenen Konzentrationen an Antikörpern. Der drainierende Lymphknoten scheint als pathogenetisches Zentrum eine wichtige Rolle zu spielen, die im vorliegenden System jedoch nicht eindeutig zu charakterisieren ist. Aus diesem Grund ist es überaus wichtig, den Adjuvans-freien Zustand im vorliegenden Modell, also vor der Krankheitsinduktion, zu betrachten, was im nächsten Abschnitt geschieht.

4.3 Das Auftreten und der Schweregrad der EBA ist bereits vor Krankheitsinduktion vorhersagbar.

Da die Induktion der experimentellen EBA trotz gleicher genetischer Ausstattung und identischer Umweltbedingungen der Versuchstiere zu eklatanten Unterschieden in der Entzündungsreaktion führt, habe ich untersucht, inwiefern sich die Tiere vor der Induktion unterscheiden. Unterschiede vor der Krankheitsinduktion wie Veränderungen im unspezifischen oder adaptiven Immunsystem können die Bereitschaft zur Entwicklung der EBA vorhersagen und ihre Pathogenese besser verstehen lassen.

SJL-Mäuse, die an EBA erkranken, zeigen eine verstärkte Expression von KC, TNF und CD11c in der Haut und von CD69 in peripheren Blutzellen vor der Krankheitsinduktion.

Bei der Analyse von Hautbiopsien, die etwa eine Woche vor der Krankheitsinduktion entnommen wurden, fallen immunologische Parameter auf, die mit dem späteren Krankheitsverlauf korrelieren. Die Betrachtung der zellulären Oberflächenmarker vor der Krankheitsinduktion zeigt eine höhere Expression von CD11c in der Haut der erkrankenden Tiere im Vergleich zu Tieren, die gesund bleiben. Zusätzlich zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von CD11c und der später betroffenen Körperoberfläche. Für die Expression von CD11c über einen mittels ROC-Methode bestimmten Schwellenwert beträgt der positiv prädiktive Wert 92,8%, an EBA zu erkranken. Der Ausschluss einer EBA-Erkrankung (negativ prädiktiver Wert) beträgt 83,3%. CD11c (synonym für Integrin alpha X) gilt als zellulärer Marker dendritischer Zellen (CD11^{high}) und Makrophagen (CD11c^{low}), die eine Sentinel-Funktion in der Immunabwehr besitzen [25, 26]; dass ihre Zahl bereits vor der Krankheitsinduktion erhöht ist und dass diese erhöhte Zahl an DCs mit über 90%iger Wahrscheinlichkeit das Krankheitsauftreten vorhersagt, zeigt Veränderungen in der angeborenen Abwehr, die das Ergebnis der Krankheitsinduktion beeinflussen. Dendritische Zellen und Makrophagen transportieren im vorliegenden Modell das Autoantigen in den Lymphknoten,

was die Voraussetzung für die pathogene T-Zell-Antwort ist. Um zu untersuchen, wie diese unterschiedliche Expression von CD11c verursacht sein kann, habe ich die Chemokin- und Zytokinexpression in der Haut vor der Krankheitsinduktion betrachtet.

Bei der Untersuchung der Expression von chemotaktischen Botenstoffen in der Haut vor der Krankheitsinduktion zeigt TNF eine stärkere Expression bei Tieren, die erkranken werden, als bei solchen, die gesund bleiben. Die erhöhte Expression von TNF besitzt einen positiv prädiktiven Wert von 92,8%, an EBA zu erkranken, während der negativ prädiktive Wert, also gesund zu bleiben, 83,3% beträgt. Die unterschiedliche Expression von TNF kann die höhere Zahl dendritischer Zellen erklären [25, 26]. Des Weiteren zeigt TNF einen inflammatorischen Prozess in der Haut vor der Krankheitsinduktion an, der trotz klinischer Gesundheit einen unterschiedlichen Aktivierungszustand des angeborenen Immunsystems vor der Krankheitsinduktion widerspiegelt. Diese subklinische Entzündung lässt sich durch die gleichzeitig erhöhte Expression von KC durch Makrophagen und Mastzellen erklären [125]. KC wird ebenfalls von erkrankenden Tieren vor der Induktion stärker exprimiert als von gesund bleibenden Tieren. Der positiv prädiktive Wert für KC beträgt 91,6%, an EBA zu erkranken. Der negativ prädiktive Wert, also gesund zu bleiben, beträgt 83,3%. Die chemotaktische Wirkung von KC auf neutrophile Granulozyten [28, 40, 72] zeigt ebenfalls die inflammatorische Veränderung im angeborenen Immunsystem vor der Krankheitsinduktion. Zusätzlich bleibt die niedrigere Expression von TNF vor der Krankheitsinduktion bei gesund bleibenden Tieren auch im weiteren Verlauf unverändert, während kranke Tiere TNF nach der Krankheitsinduktion vermehrt exprimieren.

Die stärkere Expression von CD11c, KC und TNF in der Haut vor Krankheitsinduktion kann auf verschiedene Weise zum Ausbruch der Krankheit beitragen. Die vermehrte Expression deutet eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems an. Dieses kann im aktivierten Zustand eine stärkere Immunantwort des adaptiven Immunsystems auslösen und Autoimmunkrankheiten verursachen [11, 18, 102]. Hierbei spielt die Produktion von KC und TNF durch dendritische Zellen, wie sie bei den vorliegenden Resultaten vermutet werden kann, eine entscheidende Rolle [18, 112]. Die daraus resultierende verstärkte Aktivierung der Th-Zell-Antwort zeigt sich in meiner Arbeit durch die stärkere Expression von CD3 und durch die verminderte Ratio von FoxP3/CD3 im drainierenden Lymphknoten. Die Intensität und Dauer der Th-Zell-abhängigen Immunantwort sind hierbei abhängig vom Antigen-Transport in die sekundär lymphatischen Organe [11, 114]. Die intensive Th-Zell-Antwort führt bei der experimentellen EBA zu einer gesteigerten Zahl Typ-VII-Kollagen-spezifischer Plasmazellen und ihrer Antikörper, die inflammatorische Prozesse in der Haut initiieren. Hierbei kann das aktivierte, angeborene Immunsystem die Krankheitsentstehung wiederum begünstigen, indem durch KC und TNF ein erhöhter chemotaktischer Gradient für neutrophile Granulozyten entsteht [28, 52, 125].

Bei Betrachtung der Vorhersagewerte für das Auftreten oder Ausbleiben von EBA-Symptomen fällt auf, dass das Ausbleiben der Symptome mit über 80%iger Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden kann, während für das Auftreten der Symptome eine Wahrscheinlichkeit $>90\%$

erreicht wird. Ausgehend von der empirischen Verteilung von 80% erkrankten und 20% gesunden Tieren [116], muss vor allem der Ausschluss der Erkrankung Beachtung finden. Hier zeigt sich eine Steigerung der Vorhersagewahrscheinlichkeit um 400% (von 20 auf 80%). Die hier vorgestellte Konstellation, bei gleichem genetischem Risiko und identischen Umweltbedingungen anhand der Schwankungen im angeborenen Immunsystem die Anfälligkeit für die Entwicklung einer Autoimmunkrankheit vorherzusagen, ist bislang noch nicht beschrieben worden. Die meisten prädiktiven Arbeiten zur Entstehung von Autoimmunkrankheiten zeigen für Diabetes mellitus Typ1, Pemphigus, Vitiligo und Systemischen Lupus Erythematoses eine hohe Vorhersagewahrscheinlichkeit durch den Nachweis von Autoantikörpern, die schon Jahre vor Symptombeginn nachzuweisen sind [71, 95, 111]. Dies repräsentiert jedoch den Zustand nach dem Beginn einer pathogenen Immunantwort und konnte im vorliegenden Modell bestätigt werden. Bereits nach 2 Wochen (also vor Symptombeginn) sind Unterschiede zwischen erkrankenden und gesunden Tieren in der Konzentration von Typ-VII-Kollagenspezifischen IgG2c-Antikörpern zu messen. Durch meine Ergebnisse wird zusätzlich noch der Status der völligen Gesundheit vor der eigentlichen Immunantwort erfasst. Bereits in diesem Stadium sind völlig überraschend pathogenetisch relevante Abweichungen in der Haut und auch systemisch zu identifizieren, die das Auftreten und das Ausbleiben der EBA mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhersagen. Es sollte geprüft werden, ob die vorliegenden Schwellenwerte unabhängig von Umgebungseinflüssen ihre Vorhersagekraft aufweisen oder, ob durch Modulation der einzelnen Parameter eine Veränderung in der Suszeptibilität erreicht werden kann. Insgesamt besitzen diese Ergebnisse klinische Relevanz, da sie in der Überwachung von Risiko-Patienten vor allem einen prospektiven Ausschluss der Erkrankung ermöglichen und so die Belastung dieser Patienten reduzieren.

Um die oben beschriebenen Schwankungen im angeborenen Immunsystem auch systemisch zu untersuchen, habe ich die Expression chemotaktischer und inflammatorischer Botenstoffe sowie von Oberflächenmarkern in peripheren Blutzellen untersucht. Bei der Betrachtung der Expression von Zytokinen und Oberflächenmarkern im Blut vor der Krankheitsinduktion fällt die Expression des Oberflächenmarkers CD69 auf. Tiere, die erkranken werden, zeigen eine stärkere Expression von CD69 als Tiere, die gesund bleiben. CD69 zeigt bei später erkrankenden Tieren eine Aktivierung der Immunzellen an [74, 92, 108], die besonders für neutrophile Entzündungsprozesse relevant zu sein scheint. In diesem Zusammenhang deutet die erhöhte Expression von CD69 bereits vor der Induktion der EBA eine weitere Schwankung in der Immunabwehr an, die die durch neutrophile Granulozyten bedingte Entzündungsreaktion im vorliegenden Modell fördert. Andererseits scheint CD69 auch regulatorische Eigenschaften zu besitzen [43, 109]. Aufgrund der ambivalenten und unverständlichen Rolle von CD69 mit anti- wie auch proinflammatorischer Wirkung scheint es nötig zu sein, den Einfluss dieses Moleküls auf die Entstehung der EBA tiefergehend zu untersuchen. Die durch CD69 und Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-1-vermittelte Hemmung der Lymphozytenauswanderung aus dem Lymphknoten ist bereits heute eine neue Therapie-Strategie in der Behandlung der Multiplen Sklerose [62, 85, 86, 113]. Ob die Hemmung der Lymphozyten-

auswanderung im vorliegenden Modell eine Änderung der Empfänglichkeit für EBA darstellt und ob CD69 hierbei eine Rolle spielt, wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Zusammenfassend unterscheidet die erhöhte Expression von KC, TNF und CD11c in der Haut erkrankende von gesund bleibenden Mäusen schon vor der Induktion von EBA. Dieser Unterschied kann die Erkrankung jeweils mit einer Wahrscheinlichkeit von über 90% voraussagen und -wichtiger- mit über 80% ausschließen. Dies stellt eine entscheidende Steigerung der empirischen Pretest-Wahrscheinlichkeit dar und sagt das weitere autoimmune Schicksal in einem früheren Status vorher, als dies bislang möglich war. Die Expression dieser Gene lässt die Entstehung der EBA im weiteren Verlauf gut erklären und stellt diese Moleküle in das Zentrum der Pathogenese. Die Wahrscheinlichkeitswerte sollten an einer weiteren Population getestet werden, um ihre Validität zu garantieren. Neben der lokalen Alteration in der angeborenen Immunabwehr zeigt sich mit CD69 auch eine systematische Schwankung, die neue therapeutische Perspektiven aufzeigt, die schon in klinischen Studien getestet werden, deren grundlegendes Verständnis es jedoch zu erweitern gilt.

5 Zusammenfassung

Autoimmunkrankheiten entstehen durch Immunantworten gegen körpereigene Gewebe. Sie sind in ihrer Gesamtheit häufig und nicht heilbar. In der vorliegenden Arbeit wird die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) als autoimmune Modellerkrankung im Mausmodell verwendet. Dieses Krankheitsmodell zeichnet sich durch Auftreten der Krankheit bei 80% und konstante Resistenz bei 20% der genetisch identischen Versuchstiere bei gleichen Umweltbedingungen aus. Die Untersuchung *in vivo* erfasst die komplexe Pathogenese von Autoimmunkrankheiten vom Stadium der Gesundheit über das Stadium der Autoimmunität ohne Symptome bis zur apparenten Erkrankung. Mit der real-time RT PCR sowie der Lasermikrodissektion lässt sich die Immunantwort mit hoher Präzision charakterisieren. Hierdurch können Schwankungen in jedem Abschnitt der Pathogenese hoch empfindlich untersucht werden, die trotz gleicher genetischer Ausstattung und identischen Umweltbedingungen zu einem unterschiedlichen Ergebnis der Krankheitsinduktion führen.

Die vorliegende Arbeit konnte bestätigen, dass Komplement-aktivierende IgG2c-Antikörper für die Entstehung der EBA wichtig sind und *in vivo* zu einer neutrophilen Entzündungsreaktion an der DEJ führen. Darüber hinaus gelang mir die Charakterisierung der neutrophilen Granulozyten, die sich durch eine vermehrte Expression der aktivierenden Fc γ -Rezeptoren und des Fc γ RIV im Besonderen auszeichnen. Mit TNF und MIP-1 α wurden zwei exklusiv in kranken Tieren hoch-regulierte Botenstoffe identifiziert, die den Entzündungsprozess unterhalten und trotz größt möglicher Gleichheit der Tiere den unterschiedlichen Verlauf nach EBA-Induktion verstehen lassen. Die in der Haut beschriebenen Unterschiede sind Resultat der im Lymphknoten generierten Immunantwort. Diese scheint bei gesund bleibenden Tieren eher regulatorischen Charakter zu besitzen, lässt sich aber wegen der Adjuvans-Wirkung nicht näher bezüglich Th1-, Th2- oder Th17-Einfluss charakterisieren. Als Ursache für die unterschiedliche Immunantwort nach Krankheitsinduktion lassen sich bereits vor der induktiven Intervention in den Tieren Schwankungen im angeborenen Immunsystem nachweisen, die das Auftreten der EBA mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhersagen oder ausschließen, was klinische Relevanz in der Überwachung von Hochrisiko-Patienten vor der Entstehung von Autoimmunkrankheiten besitzt. Diese Alterationen vor der Krankheitsinduktion sind sowohl lokaler als auch systemischer Art. In der Haut lassen sich die chemotaktischen und proinflammatorischen Botenstoffe TNF und KC und die Expression von CD11c von dendritischen Zellen und Makrophagen mit dem Krankheitsverlauf in Verbindung bringen. Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems scheint sowohl die initiale Th-Zell-Immunantwort als auch die später auftretenden Entzündungsprozesse in der Haut zu verstärken. Systemisch wird die Aktivierung des Immunsystems durch den Aktivierungsmarker CD69 komplettiert. Dieser bietet neue therapeutische Perspektiven in der Behandlung von Autoimmunkrankheiten, was im vorliegenden Modell sogar vor der eigentlichen Immunantwort die Krankheit verhindern könnte.

In der Zusammenschau der Ergebnisse konnten erstmals immunologische Devianzen identifiziert werden, die bei gleicher genetischer Prädisposition und identischen Umweltbedingungen vor der eigentlich pathologischen Immunantwort eine Anfälligkeit für die Krankheitsentstehung signalisieren. Dies eröffnet neue therapeutische Strategien, bei gleichem genetischem Risiko die Gefährdung für den Ausbruch einer Krankheit zu erkennen und effizient sowie gezielt zu behandeln.

6 Literaturverzeichnis

- [1] A. K. Abbas, K. M. Murphy, and A. Sher. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383:787–793, 1996.
- [2] S. Akhtar, X. Li, I. H. Chaudry, and M. A. Choudhry. Neutrophil chemokines and their role in IL-18-mediated increase in neutrophil O₂⁻ production and intestinal edema following alcohol intoxication and burn injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 297:G340–G347, 2009.
- [3] R. S. Allan, J. Waithman, S. Bedoui, C. M. Jones, J. A. Villadangos, Y. Zhan, A. M. Lew, K. Shortman, W. R. Heath, and F. R. Carbone. Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity*, 25:153–162, 2006.
- [4] J. C. Alves-Filho, F. Sônego, F. O. Souto, A. Freitas, W. A. Verri, M. Auxiliadora-Martins, A. Basile-Filho, A. N. McKenzie, D. Xu, F. Q. Cunha, and F. Y. Liew. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med*, 16:708–712, 2010.
- [5] D. Amsen, J. M. Blander, G. R. Lee, K. Tanigaki, T. Honjo, and R. A. Flavell. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell*, 117:515–526, 2004.
- [6] G. Anderson, K. L. Anderson, L. A. Conroy, T. J. Hallam, N. C. Moore, J. J. Owen, and E. J. Jenkinson. Intracellular signaling events during positive and negative selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes in vitro. *J Immunol*, 154:3636–3643, 1995.
- [7] G. Anderson, N. C. Moore, J. J. Owen, and E. J. Jenkinson. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol*, 14:73–99, 1996.
- [8] AppliedBiosystems. User Bulletin 2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. Subject: Relative Quantification of Gene Expression. *ABI*, 2001.
- [9] D. A. Armstrong, J. A. Major, A. Chudyk, and T. A. Hamilton. Neutrophil chemoattractant genes KC and MIP-2 are expressed in different cell populations at sites of surgical injury. *J Leukoc Biol*, 75:641–648, 2004.
- [10] M. F. Bachmann, M. Kopf, and B. J. Marsland. Chemokines: more than just road signs. *Nat Rev Immunol*, 6:159–164, 2006.
- [11] J. Banchereau and R. M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392:245–252, 1998.
- [12] J. Barthelmann, J. Nietsch, M. Blessenohl, T. Laskay, G. van Zandbergen, J. Westermann, and K. Kalies. The protective Th1 response in mice is induced in the T-cell

- zone only three weeks after infection with *Leishmania major* and not during early T-cell activation. *Med Microbiol Immunol*, 2011 (ahead of print).
- [13] L. Baudino, S. A. da Silveira, M. Nakata, and S. Izui. Molecular and cellular basis for pathogenicity of autoantibodies: lessons from murine monoclonal autoantibodies. *Springer Semin Immunopathol*, 28:175–184, 2006.
- [14] B. Bennett, I. J. Check, M. R. Olsen, and R. L. Hunter. A comparison of commercially available adjuvants for use in research. *J Immunol Methods*, 153:31–40, 1992.
- [15] S. Bennouna, S. K. Bliss, T. J. Curiel, and E. Y. Denkers. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol*, 171:6052–6058, 2003.
- [16] S. Bennouna and E. Y. Denkers. Microbial antigen triggers rapid mobilization of TNF-alpha to the surface of mouse neutrophils transforming them into inducers of high-level dendritic cell TNF-alpha production. *J Immunol*, 174:4845–4851, 2005.
- [17] P. Bernard, L. Vaillant, B. Labeille, C. Bedane, B. Arbeille, J. P. Denoeux, G. Lorette, J. M. Bonnetblanc, and C. Prost. Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group. *Arch Dermatol*, 131:48–52, 1995.
- [18] B. E. Berndt, M. Zhang, G.-H. Chen, G. B. Huffnagle, and J. Y. Kao. The role of dendritic cells in the development of acute dextran sulfate sodium colitis. *J Immunol*, 179:6255–6262, 2007.
- [19] K. Bieber, S. Sun, N. Ishii, M. Kasperkiewicz, E. Schmidt, M. Hirose, J. Westermann, X. Yu, D. Zillikens, and R. J. Ludwig. Animal models for autoimmune bullous dermatoses. *Exp Dermatol*, 19:2–11, 2010.
- [20] J. M. Blander and R. Medzhitov. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature*, 440:808–812, 2006.
- [21] S. Bolland and J. V. Ravetch. Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity*, 13:277–285, 2000.
- [22] S. K. Bromley, W. R. Burack, K. G. Johnson, K. Somersalo, T. N. Sims, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, and M. L. Dustin. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol*, 19:375–396, 2001.
- [23] P. P. D. Bruyn and Y. Cho. Structure and function of high endothelial postcapillary venules in lymphocyte circulation. *Curr Top Pathol*, 84:85–101, 1990.
- [24] C. B. Cairns, E. A. Panacek, A. H. Harken, and A. Banerjee. Bench to bedside: tumor necrosis factor-alpha: from inflammation to resuscitation. *Acad Emerg Med*, 7:930–941, 2000.

- [25] C. Caux, S. Ait-Yahia, K. Chemin, O. de Bouteiller, M. C. Dieu-Nosjean, B. Homey, C. Massacrier, B. Vanbervliet, A. Zlotnik, and A. Vicari. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin Immunopathol*, 22:345–369, 2000.
- [26] C. Caux, B. Vanbervliet, C. Massacrier, S. Ait-Yahia, C. Vaure, K. Chemin, M.-C. Dieu-Nosjean, , and A. Vicari. Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. *Transplantation*, 73:S7–S11, 2002.
- [27] M. Charmoy, S. Brunner-Agten, D. Aebischer, F. Auderset, P. Launois, G. Milon, A. E. I. Proudfoot, and F. Tacchini-Cottier. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog*, 6:e1000755, 2010.
- [28] A. V. Chintakuntlawar and J. Chodosh. Chemokine CXCL1/KC and its receptor CXCR2 are responsible for neutrophil chemotaxis in adenoviral keratitis. *J Interferon Cytokine Res*, 29:657–666, 2009.
- [29] M. R. Clark. IgG effector mechanisms. *Chem Immunol*, 65:88–110, 1997.
- [30] R. L. Coffman and T. R. Mosmann. Isotype regulation by helper T cells and lymphokines. *Monogr Allergy*, 24:96–103, 1988.
- [31] S. L. Constant and K. Bottomly. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol*, 15:297–322, 1997.
- [32] S. Cotell, N. D. Robinson, and L. S. Chan. Autoimmune blistering skin diseases. *Am J Emerg Med*, 18:288–299, 2000.
- [33] J. P. Coutelier, J. T. van der Logt, F. W. Heessen, G. Warnier, and J. V. Snick. IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infections. *J Exp Med*, 165:64–69, 1987.
- [34] C. L. Cozine, K. L. Wolniak, and T. J. Waldschmidt. The primary germinal center response in mice. *Curr Opin Immunol*, 17:298–302, 2005.
- [35] D. H. Cribbs, A. Ghochikyan, V. Vasilevko, M. Tran, I. Petrushina, N. Sadzikava, D. Babikyan, P. Kessler, T. Kieber-Emmons, C. W. Cotman, and M. G. Agadjanyan. Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. *Int Immunol*, 15:505–514, 2003.
- [36] S. A. da Silveira, S. Kikuchi, L. Fossati-Jimack, T. Moll, T. Saito, J. S. Verbeek, M. Botto, M. J. Walport, M. Carroll, and S. Izui. Complement activation selectively potentiates the pathogenicity of the IgG2b and IgG3 isotypes of a high affinity anti-erythrocyte autoantibody. *J Exp Med*, 195:665–672, 2002.

- [37] J. M. Daley, A. A. Thomay, M. D. Connolly, J. S. Reichner, and J. E. Albina. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol*, 83:64–70, 2008.
- [38] A. Davidson and B. Diamond. Autoimmune diseases. *N Engl J Med*, 345:340–350, 2001.
- [39] W. V. den Broeck, A. Derore, and P. Simoens. Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrI mice. *J Immunol Methods*, 312:12–19, 2006.
- [40] M. R. DiStasi and K. Ley. Opening the flood-gates: how neutrophil-endothelial interactions regulate permeability. *Trends Immunol*, 30:547–556, 2009.
- [41] A. R. Duncan and G. Winter. The binding site for C1q on IgG. *Nature*, 332:738–740, 1988.
- [42] A. R. Duncan, J. M. Woof, L. J. Partridge, D. R. Burton, and G. Winter. Localization of the binding site for the human high-affinity Fc receptor on IgG. *Nature*, 332:563–564, 1988.
- [43] E. Esplugues, D. Sancho, J. Vega-Ramos, C. Martínez, U. Syrbe, A. Hamann, P. Engel, F. Sánchez-Madrid, and P. Lauzurica. Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69. *J Exp Med*, 197:1093–1106, 2003.
- [44] J. D. Fontenot and A. Y. Rudensky. Molecular aspects of regulatory T cell development. *Semin Immunol*, 16:73–80, 2004.
- [45] J. D. Fontenot and A. Y. Rudensky. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol*, 6:331–337, 2005.
- [46] P. Fritsch. *Kapitel 1: Einführung: Das Organ Haut und seine Krankheiten. In: Dermatologie & Venerologie für das Studium, 1. Auflage, 2-5.* Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2009.
- [47] W. R. Gammon, D. F. Murrell, M. W. Jenison, K. M. Padilla, P. S. Prisayanh, D. A. Jones, R. A. Briggaman, and S. W. Hunt. Autoantibodies to type VII collagen recognize epitopes in a fibronectin-like region of the noncollagenous (NC1) domain. *J Invest Dermatol*, 100:618–622, 1993.
- [48] J. E. Gretz, A. O. Anderson, and S. Shaw. Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex. *Immunol Rev*, 156:11–24, 1997.

- [49] J. E. Gretz, E. P. Kaldjian, A. O. Anderson, and S. Shaw. Sophisticated strategies for information encounter in the lymph node: the reticular network as a conduit of soluble information and a highway for cell traffic. *J Immunol*, 157:495–499, 1996.
- [50] H. M. Gürcan and A. R. Ahmed. Current concepts in the treatment of epidermolysis bullosa acquisita. *Expert Opin Pharmacother*, 12:1259–1268, 2011.
- [51] P. Haley, R. Perry, D. Ennulat, S. Frame, C. Johnson, J.-M. Lapointe, A. Nyska, P. Snyder, D. Walker, G. Walter, and S. T. P. I. W. Group. STP position paper: best practice guideline for the routine pathology evaluation of the immune system. *Toxicol Pathol*, 33:404–7, 2005.
- [52] K. Hayashida, W. C. Parks, and P. W. Park. Syndecan-1 shedding facilitates the resolution of neutrophilic inflammation by removing sequestered CXC chemokines. *Blood*, 114:3033–3043, 2009.
- [53] N. Hogg, R. Henderson, B. Leitinger, A. McDowall, J. Porter, and P. Stanley. Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. *Immunol Rev*, 186:164–171, 2002.
- [54] K. Hollowood and J. R. Goodlad. Germinal centre cell kinetics. *J Pathol*, 185:229–233, 1998.
- [55] C. S. Hsieh, S. E. Macatonia, C. S. Tripp, S. F. Wolf, A. O’Garra, and K. M. Murphy. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, 260:547–549, 1993.
- [56] R. L. Hunter and B. Bennett. The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants. II. Antibody formation and inflammation related to the structure of triblock and octablock copolymers. *J Immunol*, 133:3167–3175, 1984.
- [57] R. L. Hunter and B. Bennett. The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants. III. Characterization of selected biologically active surfaces. *Scand J Immunol*, 23:287–300, 1986.
- [58] N. Ishii, T. Hamada, T. Dainichi, T. Karashima, T. Nakama, S. Yasumoto, D. Zillikens, and T. Hashimoto. Epidermolysis bullosa acquisita: what’s new? *J Dermatol*, 37:220–230, 2010.
- [59] A. A. Itano and M. K. Jenkins. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat Immunol*, 4:733–739, 2003.
- [60] A. Jäger and V. K. Kuchroo. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand J Immunol*, 72:173–184, 2010.
- [61] C. A. Janeway and R. Medzhitov. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20:197–216, 2002.

- [62] D. R. Jeffery, C. E. Markowitz, A. T. Reder, B. Weinstock-Guttman, and K. Tobias. Fingolimod for the treatment of relapsing multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother*, 11:165–183, 2011.
- [63] R. Jung, K. Soondrum, and M. Neumaier. Quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med*, 38:833–836, 2000.
- [64] E. P. Kaldjian, J. E. Gretz, A. O. Anderson, Y. Shi, and S. Shaw. Spatial and molecular organization of lymph node T cell cortex: a labyrinthine cavity bounded by an epithelium-like monolayer of fibroblastic reticular cells anchored to basement membrane-like extracellular matrix. *Int Immunol*, 13:1243–1253, 2001.
- [65] K. Kalies, M. Blessenohl, J. Nietsch, and J. Westermann. 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.
- [66] T. Kamradt and N. A. Mitchison. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med*, 344:655–664, 2001.
- [67] M. Kasperkiewicz and E. Schmidt. Current treatment of autoimmune blistering diseases. *Curr Drug Discov Technol*, 6:270–280, 2009.
- [68] J. D. Katz, B. Wang, K. Haskins, C. Benoist, and D. Mathis. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. *Cell*, 74:1089–1100, 1993.
- [69] J. H. Kim, Y. H. Kim, and S.-C. Kim. Epidermolysis bullosa acquisita: a retrospective clinical analysis of 30 cases. *Acta Derm Venereol*, 91:307–312, 2011.
- [70] K. Kimura, S. Sekiguchi, S. Hayashi, Y. Hayashi, T. Hishima, M. Nagaki, and M. Kohara. Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury. *J Leukoc Biol*, 89:433–442, 2011.
- [71] M. Knip, S. Korhonen, P. Kulmala, R. Veijola, A. Reunanen, O. T. Raitakari, J. Viikari, and H. K. Akerblom. Prediction of type 1 diabetes in the general population. *Diabetes Care*, 33:1206–1212, 2010.
- [72] Y. Kobayashi. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci*, 13:2400–2407, 2008.
- [73] T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*, 27:485–517, 2009.
- [74] A. Lamana, D. Sancho, A. Cruz-Adalia, G. M. del Hoyo, A. M. Herrera, M. Feria, F. Díaz-González, M. Gómez, and F. Sánchez-Madrid. The role of CD69 in acute neutrophil-mediated inflammation. *Eur J Immunol*, 36:2632–2638, 2006.

- [75] J. C. Lapiere, D. T. Woodley, M. G. Parente, T. Iwasaki, K. C. Wynn, A. M. Christiano, and J. Uitto. Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. *J Clin Invest*, 92:1831–1839, 1993.
- [76] Y. K. Lee, R. Mukasa, R. D. Hatton, and C. T. Weaver. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr Opin Immunol*, 21:274–280, 2009.
- [77] M. Leenaars, M. A. Koedam, C. F. Hendriksen, and E. Claassen. Immune responses and side effects of five different oil-based adjuvants in mice. *Vet Immunol Immunopathol*, 61:291–304, 1998.
- [78] B. P. Leung, S. Culshaw, J. A. Gracie, D. Hunter, C. A. Canetti, C. Campbell, F. Cunha, F. Y. Liew, and I. B. McInnes. A role for IL-18 in neutrophil activation. *J Immunol*, 167:2879–2886, 2001.
- [79] B. P. Leung, I. B. McInnes, E. Esfandiari, X. Q. Wei, and F. Y. Liew. Combined effects of IL-12 and IL-18 on the induction of collagen-induced arthritis. *J Immunol*, 164:6495–6502, 2000.
- [80] Z. Li, C. J. Woo, M. D. Iglesias-Ussel, D. Ronai, and M. D. Scharff. The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes Dev*, 18:1–11, 2004.
- [81] P. Macchi, S. Kroening, I. M. Palacios, S. Baldassa, B. Grunewald, C. Ambrosino, B. Goetze, A. Lupas, D. S. Johnston, and M. Kiebler. Barentsz, a new component of the Staufen-containing ribonucleoprotein particles in mammalian cells, interacts with Staufen in an RNA-dependent manner. *J Neurosci*, 23:5778–5788, 2003.
- [82] I. C. MacLennan. Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, 12:117–139, 1994.
- [83] J. A. Madri and D. Graesser. Cell migration in the immune system: the evolving inter-related roles of adhesion molecules and proteinases. *Dev Immunol*, 7:103–116, 2000.
- [84] L. J. McHeyzer-Williams, L. P. Malherbe, and M. G. McHeyzer-Williams. Helper T cell-regulated B cell immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*, 311:59–83, 2006.
- [85] M. Mehling, P. Hilbert, S. Fritz, B. Durovic, D. Eichen, O. Gasser, J. Kuhle, T. Klimkait, R. L. P. Lindberg, L. Kappos, and C. Hess. Antigen-specific adaptive immune responses in fingolimod-treated multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*, 69:408–413, 2011.
- [86] M. Mehling, T. A. Johnson, J. Antel, L. Kappos, and A. Bar-Or. Clinical immunology of the sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Neurology*, 76:S20–S27, 2011.

- [87] S. Mihai and C. Sitaru. Immunopathology and molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases. *J Cell Mol Med*, 11:462–481, 2007.
- [88] L. S. Miller, E. M. Pietras, L. H. Uricchio, K. Hirano, S. Rao, H. Lin, R. M. O’Connell, Y. Iwakura, A. L. Cheung, G. Cheng, and R. L. Modlin. Inflammasome-mediated production of IL-1beta is required for neutrophil recruitment against *Staphylococcus aureus* in vivo. *J Immunol*, 179:6933–6942, 2007.
- [89] P. Miossec, T. Korn, and V. K. Kuchroo. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*, 361:888–898, 2009.
- [90] M. Moser and K. M. Murphy. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol*, 1:199–205, 2000.
- [91] T. R. Mosmann and R. L. Coffman. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 7:145–173, 1989.
- [92] K. Murata, M. Inami, A. Hasegawa, S. Kubo, M. Kimura, M. Yamashita, H. Hosokawa, T. Nagao, K. Suzuki, K. Hashimoto, H. Shinkai, H. Koseki, M. Taniguchi, S. F. Ziegler, and T. Nakayama. CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies. *Int Immunol*, 15:987–992, 2003.
- [93] K. Murphy, P. Travers, and M. Walport. *Chapter 2: Innate Immunity. In: Janeway’s Immunobiology 7th edition, 39-52.* Garland Science, Taylor & Francis Group, LCC, New York, 2008.
- [94] K. Murphy, P. Travers, and M. Walport. *Chapter 8: T Cell-Mediated Immunity. In: Janeway’s Immunobiology 7th edition, 343-356.* Garland Science, Taylor & Francis Group, LCC, New York, 2008.
- [95] A.-L. Nancy and S. Yehuda. Prediction and prevention of autoimmune skin disorders. *Arch Dermatol Res*, 301:57–64, 2009.
- [96] F. Nimmerjahn. Activating and inhibitory FcgammaRs in autoimmune disorders. *Springer Semin Immunopathol*, 28:305–319, 2006.
- [97] F. Nimmerjahn, P. Bruhns, K. Horiuchi, and J. V. Ravetch. FcgammaRIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity*, 23:41–51, 2005.
- [98] F. Nimmerjahn and J. V. Ravetch. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science*, 310:1510–1512, 2005.
- [99] W. Nishie, D. Sawamura, M. Goto, K. Ito, A. Shibaki, J. R. McMillan, K. Sakai, H. Nakamura, E. Olasz, K. B. Yancey, M. Akiyama, and H. Shimizu. Humanization of autoantigen. *Nat Med*, 13:378–383, 2007.

- [100] R. J. Noelle, M. Roy, D. M. Shepherd, I. Stamenkovic, J. A. Ledbetter, and A. Aruffo. A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89:6550–6554, 1992.
- [101] S. A. Omori, M. H. Cato, A. Anzelon-Mills, K. D. Puri, M. Shapiro-Shelef, K. Calame, and R. C. Rickert. Regulation of class-switch recombination and plasma cell differentiation by phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Immunity*, 25:545–557, 2006.
- [102] J. E. Qualls, A. M. Kaplan, N. van Rooijen, and D. A. Cohen. Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol*, 80:802–815, 2006.
- [103] C. D. L. Ramos, C. Canetti, J. T. Souto, J. S. Silva, C. M. Hogaboam, S. H. Ferreira, and F. Q. Cunha. MIP-1alpha[CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF-alpha and LTB4. *J Leukoc Biol*, 78:167–177, 2005.
- [104] J. V. Ravetch and S. Bolland. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol*, 19:275–290, 2001.
- [105] J. Remington, M. Chen, J. Burnett, and D. T. Woodley. Autoimmunity to type VII collagen: epidermolysis bullosa acquisita. *Curr Dir Autoimmun*, 10:195–205, 2008.
- [106] N. Romani, G. Ratzinger, K. Pfaller, W. Salvenmoser, H. Stössel, F. Koch, and P. Stoitzner. Migration of dendritic cells into lymphatics—the Langerhans cell example: routes, regulation, and relevance. *Int Rev Cytol*, 207:237–270, 2001.
- [107] G. Sainte-Marie, F. S. Peng, and C. Bélisle. Overall architecture and pattern of lymph flow in the rat lymph node. *Am J Anat*, 164:275–309, 1982.
- [108] D. Sancho, M. Gómez, and F. Sánchez-Madrid. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol*, 26:136–140, 2005.
- [109] D. Sancho, M. Gómez, F. Viedma, E. Esplugues, M. Gordón-Alonso, M. A. García-López, H. de la Fuente, C. Martínez-A, P. Lauzurica, and F. Sánchez-Madrid. CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis. *J Clin Invest*, 112:872–882, 2003.
- [110] C. Schierwagen, A. C. Bylund-Fellenius, and C. Lundberg. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. *J Pharmacol Methods*, 23:179–186, 1990.
- [111] R. H. Scofield. Autoantibodies as predictors of disease. *Lancet*, 363:1544–1546, 2004.
- [112] T. Shea-Donohue, K. Thomas, M. J. Cody, A. Zhao, L. J. Detolla, K. M. Kopydlowski, M. Fukata, S. A. Lira, and S. N. Vogel. Mice deficient in the CXCR2 ligand, CXCL1

- (KC/GRO-alpha), exhibit increased susceptibility to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *Innate Immun*, 14:117–124, 2008.
- [113] L. R. Shiow, D. B. Rosen, N. Brdicková, Y. Xu, J. An, L. L. Lanier, J. G. Cyster, and M. Matloubian. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*, 440:540–544, 2006.
- [114] N. Singh and R. Schwartz. The strength of persistent antigenic stimulation modulates adaptive tolerance in peripheral CD4+ T cells. *J Exp Med*, 198:1107–1117, 2003.
- [115] A. G. Sitaru, A. Sesarman, S. Mihai, M. T. Chiriac, D. Zillikens, P. Hultman, W. Solbach, and C. Sitaru. T cells are required for the production of blister-inducing autoantibodies in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Immunol*, 184:1596–1603, 2010.
- [116] C. Sitaru, M. T. Chiriac, S. Mihai, J. Büning, A. Gebert, A. Ishiko, and D. Zillikens. Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice. *J Immunol*, 177:3461–3468, 2006.
- [117] C. Sitaru, C. Dähnrich, C. Probst, L. Komorowski, I. Blöcker, E. Schmidt, W. Schlumberger, C. Rose, W. Stöcker, and D. Zillikens. Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies. *Exp Dermatol*, 16:770–777, 2007.
- [118] C. Sitaru, A. Kromminga, T. Hashimoto, E. B. Bröcker, and D. Zillikens. 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.
- [119] C. Sitaru, S. Mihai, C. Otto, M. T. Chiriac, I. Hausser, B. Dotterweich, H. Saito, C. Rose, A. Ishiko, and D. Zillikens. Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *J Clin Invest*, 115:870–878, 2005.
- [120] B. R. Smoller and D. T. Woodley. Differences in direct immunofluorescence staining patterns in epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol*, 27:674–678, 1992.
- [121] J. R. Stanley and M. Amagai. Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. *N Engl J Med*, 355:1800–1810, 2006.
- [122] H. Ujiie, A. Shibaki, W. Nishie, D. Sawamura, G. Wang, Y. Tateishi, Q. Li, R. Moriuchi, H. Qiao, H. Nakamura, M. Akiyama, and H. Shimizu. A novel active mouse model for bullous pemphigoid targeting humanized pathogenic antigen. *J Immunol*, 184:2166–2174, 2010.

- [123] W. A. Verri, T. M. Cunha, S. H. Ferreira, X. Wei, B. P. Leung, A. Fraser, I. B. McInnes, F. Y. Liew, and F. Q. Cunha. IL-15 mediates antigen-induced neutrophil migration by triggering IL-18 production. *Eur J Immunol*, 37:3373–3380, 2007.
- [124] W. A. Verri, F. O. Souto, S. M. Vieira, S. C. L. Almeida, S. Y. Fukada, D. Xu, J. C. Alves-Filho, T. M. Cunha, A. T. G. Guerrero, R. B. Mattos-Guimaraes, F. R. Oliveira, M. M. Teixeira, J. S. Silva, I. B. McInnes, S. H. Ferreira, P. Louzada-Junior, F. Y. Liew, and F. Q. Cunha. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis*, 69:1697–1703, 2010.
- [125] S. M. Vieira, H. P. Lemos, R. Grespan, M. H. Napimoga, D. Dal-Secco, A. Freitas, T. M. Cunha, W. A. Verri, D. A. Souza-Junior, M. C. Jamur, K. S. Fernandes, C. Oliver, J. S. Silva, M. M. Teixeira, and F. Q. Cunha. A crucial role for TNF-alpha in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. *Br J Pharmacol*, 158:779–789, 2009.
- [126] C. G. Vinuesa, I. Sanz, and M. C. Cook. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*, 9:845–857, 2009.
- [127] S. Wang, G. Zhu, A. I. Chapoval, H. Dong, K. Tamada, J. Ni, and L. Chen. Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood*, 96:2808–2813, 2000.
- [128] S. J. Weiss. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*, 320:365–376, 1989.
- [129] C. L. Willard-Mack. Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Toxicol Pathol*, 34:409–424, 2006.
- [130] D. T. Woodley, R. A. Briggaman, E. J. O’Keefe, A. O. Inman, L. L. Queen, and W. R. Gammon. Identification of the skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. *N Engl J Med*, 310:1007–1013, 1984.
- [131] D. T. Woodley, J. Remington, and M. Chen. Autoimmunity to type VII collagen: epidermolysis bullosa acquisita. *Clin Rev Allergy Immunol*, 33:78–84, 2007.
- [132] X. J. Zhu, Y. Niimi, and J. C. Bystry. Epidermolysis bullosa acquisita. Incidence in patients with basement membrane zone antibodies. *Arch Dermatol*, 126:171–174, 1990.
- [133] J. C. Zúñiga-Pflücker and M. J. Lenardo. Regulation of thymocyte development from immature progenitors. *Curr Opin Immunol*, 8:215–224, 1996.

7 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

AID	Activity Induced Cytosin Deaminase
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase
BAFF	B-cell activating factor of the TNF family
BSA	Bovines Serum-Albumin
CC	Cystein-Cystein (Aminosäuresequenz)
CCL	C-C chemokine ligand
CCR	C-C chemokine receptor
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CXC	Cystein-X-Cystein (Aminosäuresequenz)
CXCL	CXC chemokine receptor ligand
CXCR	CXC chemokine receptor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEJ	dermo-epidermale Junktionszone
DIF	direkte Immunfluoreszenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DN	Desoxyribonukleotid
EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fc-epsilon R	Rezeptor für das Fc-Fragment von IgE
Fc-gamma R	Rezeptor für das Fc-Fragment von IgG
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	Forkhead box P3

GATA3	Transkriptionsfaktor der GATA-Familie
GR-1	Granulocyte-1
GST	Glutathion-S-Transferase
HEV	hoch endotheliale Venulen
HRP	Horseradish Peroxidase
HTMB	Hexadecyltrimethylammonium-Bromid
ICAM	Intracellular adhesion molecule
ICOS	Inducible costimulator
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KOF	Körperoberfläche
KC	Keratinocyte-derived Chemokine
Ki-67	Proliferationsmarker (Kiel-67)
LFA	Lymphocyte-function associated antigen
mCol7C	Fragment aus der NC-1-Domäne von Typ-VII-Kollagen
mRNA	messenger RNA
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP	Macrophage inflammatory protein
MLN	Metastatic lymph node
MPO	Myeloperoxidase
NaCl	Natriumchlorid
NC	non-collageneous
nTreg	natural regulatory T cells
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
RANTES	Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted
RGS	Regulator of G-protein signaling
RLT	RNA lysis buffer
RNA	Ribonukleinsäure (engl. acid)
RN	Ribonucleotid
ROC	Receiver operating characteristic
RORgamma-t	RAR-related orphan receptor gamma in T cells
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SJL	Swiss Jim Lambert
SPF	Spezifisch-Pathogen-frei
SYBR	Cyanin-Farbstoff
T-bet	T-box expressed in T cells
Taq	Thermus / Thermophilus aquaticus
TBS-T	Tris-buffered saline and tween
TEC-3	entspricht Ki-67
TGF	Transforming growth factor
Th1	T-Helfer-Zelltyp 1
Th17	T-Helfer-Zelltyp 17
Th2	T-Helfer-Zelltyp 2
TLR	toll-like Rezeptoren
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-necrosis factor
TRIS	Kurzform für Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VLA	Very late antigen

Abbildungsverzeichnis

- 1.1 **Kompartimente des murinen Lymphknotens.** Mikroskopische Darstellung mittels immunhistochemischer Färbung. In der Peripherie liegt die B-Zell-Zone (Cortex, B220⁺, blau). Weiter zentral liegt die T-Zell-Zone (Paracortex, TCR β ⁺, braun). Dazwischen sind die Keimzentren in den Sekundärfollikeln lokalisiert (Ki-67⁺, magenta). Dendritische Zellen wandern über die afferenten Lymphbahnen in den Marginalsinus ein (1). Von dort gelangen sie über radiäre Lymphsinus in den Paracortex. Hier verlassen sie die Lymphsinus und wandern in die T-Zell-Zone aus (2). T- und B- Lymphozyten gelangen über Blutgefäße in den Lymphknoten (3); sie verlassen die Blutbahn im Bereich der hochendothelialen Venulen (4). T-Zellen treffen im Paracortex auf dendritische Zellen, die ihr spezifisches Antigen präsentieren, und werden aktiviert (5). B-Zellen wandern durch die T-Zell-Zone zum Cortex (6). An der Grenze zwischen Paracortex und Cortex treffen aktivierte T-Zellen auf B-Zellen und aktivieren diese (7). B-Zellen bilden ein Keimzentrum und proliferieren zu Plasmazellen und Gedächtniszellen (8). Sie wandern in die Medulla (ungefärbt) und produzieren Antikörper (9). 10fache Vergrößerung. 3fach Färbung durch graphische Projektion aus einer Doppel- und einer Einfach-Färbung. Referenzen im Abschnitt 1.2. 9
- 2.1 **Versuchsablauf:** Dargestellt ist der Versuchsablauf des prädiktiven Versuches. Es werden eine Woche vor der Krankheitsinduktion Haut- und Blutproben entnommen. Im Alter von 8-10 Wochen erfolgt die Krankheitsinduktion. 2 Wochen nach Krankheitsinduktion wird der Versuchsgruppe ein Lymphknoten entnommen. Der Kontrollgruppe wird kein Lymphknoten entnommen. Im folgenden Zeitraum werden die Tiere klinisch wöchentlich evaluiert; es erfolgen zwei weitere Blutentnahmen. Die Opferung erfolgt 10 Wochen nach der Krankheitsinduktion. Rechts werden die drei untersuchten Stadien des Experimentes bezeichnet. Die Probenentnahme vor Krankheitsinduktion stellt den gesunden Zustand dar; im Lymphknoten nach 2 Wochen wird die potenziell pathogene Immunantwort charakterisiert; der klinische Endpunkt wird durch die klinische Evaluation und die folgende Probenentnahme beschrieben. . . . 16
- 2.2 **Exstirpation des poplitealen Lymphknotens (1).** Weiterhin zu erkennen sind die Vena saphena magna (2) und der Musculus gastrocnemius (3). Nach dem Hautschnitt erfolgt die Identifikation der anatomischen Landmarken (A) und die stumpfe Präparation des Lymphknotens (B). Wundverschluss (C). . . 18

- 2.3 **Lasermikrodissektion:** Durch Laser-Energie lassen sich die einzelnen Kompartimente des Lymphknotens präzise ausschneiden und trennen. Anschließend können die Kompartimente getrennt voneinander untersucht werden. Es wird eine Toluidin-Blau-Färbung benutzt. Hier Darstellung einer immunhistochemischen Färbung. B-Zellen: B220⁺(blau); T-Zellen: TCR β ⁺(braun); proliferierende Zellen: Ki-67⁺(magenta). 2,5fache Vergrößerung. 3fach Färbung durch graphische Projektion aus einer Doppel- und einer Einfach-Färbung. 22
- 3.1 **EBA-typische Läsionen bei erkrankten SJL-Mäusen nach Krankheitsinduktion mit mCol7C und Titermax.** Prädilektionsstellen sind die Ohren (A,B). Desweiteren treten die Blasen und Erosionen im Bereich der Hinterbeine und des Schwanzes auf (C). Die Symptome sind im Verlauf progredient und heilen bis zum Versuchsende (10 Wochen nach Krankheitsinduktion) nicht ab. Während der Untersuchung in Narkose sind die Augen zum Schutz gegen Austrocknung mit Feuchtigkeitscreme (Bepanthen®) bedeckt. 29
- 3.2 **Vergleich von Mäusen, denen nach zwei Wochen der linke popliteale Lymphknoten entfernt wurde, mit nicht operierten Mäusen.** Zum Zeitpunkt der Operation sind alle Tiere gesund. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Schwere der EBA (in % maximal betroffener Körperoberfläche) im weiteren Verlauf. Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels MANN-WHITNEY U-Test; n.s. = $p > 0,05$ 30
- 3.3 **Krankheitsverlauf (A) und Maximal-Score (B) der experimentellen EBA (in % betroffener Körperoberfläche).** Es ist im zeitlichen Verlauf eine Gruppe besonders schwer erkrankter Tiere zu erkennen, die von einer intermediären Gruppe sowie den gesunden Tieren zu unterscheiden ist (A). Die kranken Extremtiere sind 8 Wochen nach Krankheitsinduktion am schwersten betroffen. Bei Betrachtung des maximal erreichten Krankheitsgrades sind diese Gruppierungen ebenfalls nachzuvollziehen (B). Darstellung in B als Boxplot mit Median, 25., 75. Percentile und Ausreißern. $n_{gesamt}=28$; $n_{krank}=22$ (78,57%); $n_{gesund}=6$ (21,43 %) 31
- 3.4 **Expression von IL21 zehn Wochen nach Krankheitsinduktion.** Zu diesem Zeitpunkt wird zwischen kranken und gesunden Tieren differenziert. Kranke Tiere zeigen eine stärkere Expression von IL21. IL21 wird einer Th17-Immunantwort zugerechnet. Alle weiteren Zytokine, Zellmarker oder Transkriptionsfaktoren zeigen keinen Unterschied zwischen kranken und gesunden Tieren. Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Tests; * $p < 0,05$; (je $n=10$). 32

- 3.5 Quantifizierung von Typ-VII-Kollagen-spezifischen Plasmazellen zehn Wochen nach Krankheitsinduktion im poplitealen Lymphknoten.** Die Plasmazellen wurden immunhistochemisch mit CD138 (Syndecan-1) markiert. Die Antigen-Spezifität wurde durch den Nachweis Typ-VII-Kollagen-spezifischer B-Zell-Rezeptoren bestimmt (A). Nach zehn Wochen ist bei den kranken Tieren eine höhere Anzahl pathogenetisch relevanter Plasmazellen nachzuweisen (B). Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; (je $n=6-10$); Vergrößerung 400x. 33
- 3.6 Quantifizierung der Anti-Typ-VII-Kollagen IgG-Subklassen.** Die Quantifizierung erfolgt mittels ELISA im Serum der Tiere. Die Serumproben wurden alle 2 Wochen entnommen. Das Komplement-bindende IgG2c ist im Verlauf bei kranken Tieren in größerer Konzentration nachweisbar als bei gesunden Tieren. Sowohl IgG2b als auch das inhibitorische IgG1 ist bei kranken Tieren nur nach 4 Wochen erhöht. Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (je $n=10$). 34
- 3.7 Quantifizierung der IgG2c- und C3-Deposition am Typ-VII-Kollagen der DEJ.** Die Proben (Zeitpunkt: 10 Wochen) wurden mittels Direkter Immunfluoreszenz (DIF) analysiert. Kranke Tiere weisen eine größere Zahl komplement-aktivierender IgG2c-Antikörper an der DEJ auf. Konsekutiv weisen sie auch eine stärkere Komplement-Ablagerung in der Haut auf. Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich durch MANN-WHITNEY U-Test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (je $n=10$). Vergrößerung 400x. 36
- 3.8 Quantifizierung der Entzündungsaktivität in der Haut.** Kranke Tiere weisen mehr neutrophile Granulozyten auf, was den inflammatorischen Charakter der Krankheit unterstreicht (A,B). Das neutrophile Infiltrat (B) zeigt die Entzündung an, die zu den Hautläsionen führt. Die Quantifizierung der neutrophilen Granulozyten (C, GR-1-mRNA, GR-1⁺-Zellen, MPO-Aktivität) in der Ohrhaut von kranken und gesunden Tieren bestätigt das mikroskopische Bild. Balken= $200\mu\text{m}$; Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Tests, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (je $n=10$). 37

- 3.9 **Expression von Fc γ -Rezeptoren vor und zehn Wochen nach Krankheitsinduktion in der Haut gesunder und kranker Tiere.** Dargestellt ist die Expression der Fc γ -Rezeptoren als Vielfaches des Ausgangswertes vor Krankheitsinduktion (durchgezogene Linie; Wert=1). Fc γ RI, IIb und III werden von kranken und gesunden Tieren stärker nach als vor Krankheitsinduktion exprimiert. Fc γ RIV wird ausschließlich von kranken Tieren vermehrt exprimiert. Der inhibitorische Fc γ RIIb zeigt keinen Unterschied in der Expression zwischen kranken und gesunden Tieren. Alle anderen Fc γ -Rezeptoren werden stärker von kranken als von gesunden Tieren exprimiert. Das Verhältnis von aktivierenden zu inhibierenden Rezeptoren steigt nur bei kranken Tieren nach EBA-Induktion an und ist größer als in gesunden Tieren. Logarithmische Darstellung; Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels WILCOXON Rang-Test und MANN-WHITNEY U-Test, *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 (n=6-28). 39
- 3.10 **Expression von Zytokinen und Chemokinen, die die Migration neutrophiler Granulozyten fördern, 10 Wochen nach Krankheitsinduktion.** Dargestellt ist die Expression des jeweiligen Botenstoffes als Vielfaches des Ausgangswertes vor Krankheitsinduktion (durchgezogene Linie; Wert=1) IL1 β , KC, IL-18 und IL-33 werden nach Krankheitsinduktion von kranken und gesunden Tieren verstärkt exprimiert. Mit Ausnahme von IL-18 und IL-33 werden alle Mediatoren von kranken stärker als von gesunden Tieren exprimiert. MIP-1 α und TNF werden ausschließlich von kranken Tieren verstärkt exprimiert. Logarithmische Darstellung; Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels WILCOXON Rang-Test und MANN-WHITNEY U-Test, *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 (n=6-28). 40
- 3.11 **Expression von Oberflächenmarkern in der Haut 10 Wochen nach Krankheitsinduktion.** Dargestellt ist die Expression des jeweiligen Botenstoffes als Vielfaches des Ausgangswertes vor Krankheitsinduktion (durchgezogene Linie; Wert=1) CD3 ϵ wird nur in der Haut kranker Tiere vermindert exprimiert; gesunde Tiere zeigen keine Änderung in der CD3 ϵ -Expression. Logarithmische Darstellung; Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels WILCOXON Rang-Test und MANN-WHITNEY U-Test, *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 (n=6-28). 41

- 3.12 **Expression von Typ-VII-Kollagen in der Haut 10 Wochen nach der Krankheitsinduktion in gesunden und kranken Tieren.** Dargestellt ist die Expression von Typ-VII-Kollagen als Vielfaches des Ausgangswertes vor Krankheitsinduktion (durchgezogene Linie; Wert=1). Gesunde und kranke Tiere zeigen im Vergleich zu vor der Krankheitsinduktion eine verstärkte Expression von Typ-VII-Kollagen. Kranke Tiere zeigen keine vermehrte Expression verglichen mit gesunden Tieren. Logarithmische Darstellung; Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels WILCOXON Rang-Test und MANN-WHITNEY U-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (n=6-28). 42
- 3.13 **Typ-VII-Kollagen-spezifisches Keimzentrum zwei Wochen nach Krankheitsinduktion.** Es sind dunkle (1) und helle (2) Zonen in der Kernfärbung zu unterscheiden (A). In der hellen Zone lassen sich ausdifferenzierte Zentrozyten identifizieren (3, B), die spezifisch gegen Typ-VII-Kollagen gerichtet sind. Vergrößerung 400x. 44
- 3.14 **Expression von CD3 und Anteil der regulatorischen T-Zellen im Gesamtymphknoten zwei Wochen nach Krankheitsinduktion.** Zu diesem Zeitpunkt sind alle Tiere gesund. Die Zuordnung krank und gesund erfolgt nach Verlaufsbeobachtung am Ende des Experiments. Kranke Tiere besitzen mehr T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten, bevor es zum Ausbruch von Symptomen kommt. Gesunde Tiere weisen einen höheren Anteil regulatorischer T-Zellen auf als kranke. Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; (je n=6). 45
- 3.15 **Expression der Th1-assoziierten Zytokine im Gesamtymphknoten zwei Wochen nach Krankheitsinduktion.** Zu diesem Zeitpunkt sind alle Tiere gesund. Die Zuordnung krank und gesund erfolgt nach Verlaufsbeobachtung am Ende des Experiments. Kranke und gesunde Tiere zeigen keinen Unterschied bezüglich der Expression von $IFN\gamma$ und IL12p40. IL12p40 ist ebenfalls ein Bestandteil von IL23. Die Analyse von IL12p35 (IL12-spezifisch) im T-Zell-Kompartiment erbrachte ebenfalls keinen Unterschied. Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Tests; n.s. $p > 0,05$; (je n=6). 46
- 3.16 **Expression der Th2-assoziierten Zytokine im Gesamtymphknoten zwei Wochen nach Krankheitsinduktion.** Zu diesem Zeitpunkt sind alle Tiere gesund. Die Zuordnung krank und gesund erfolgt nach Verlaufsbeobachtung am Ende des Experiments. Kranke und gesunde Tiere zeigen keinen Unterschied bezüglich der Expression von IL4 und IL10. Die Analyse von IL4 und IL10 im T-Zell-Kompartiment erbrachte ebenfalls keinen Unterschied. Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Test; n.s. $p > 0,05$; (je n=6). 46

- 3.17 Verhältnis der Expression von AID in Keimzentren verglichen mit der B-Zone zwei Wochen nach Krankheitsinduktion.** Die Zentrozyten und Zentroblasten kranker und gesunder Tiere exprimieren vermehrt AID verglichen mit den Zellen der B-Zell-Zone (Ratio > 1). Das Enzym AID ist für die somatische Hypermutation und die Affinitätsreifung der B-Zellen im Keimzentrum verantwortlich. Eine erhöhte Expression ist gleichfalls ein Apoptose-Signal. B-Zellen in Keimzentren gesunder Tiere exprimieren AID verglichen mit Zellen der B-Zone stärker als Keimzentrumszellen kranker Tiere. Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Test, *p < 0,05; (je n=6). 48
- 3.18 Expression von CD69 in peripheren Blutzellen eine Woche vor Krankheitsinduktion.** Zu diesem Zeitpunkt sind alle Tiere gesund. Die Zuordnung krank und gesund erfolgt nach Verlaufsbeobachtung am Ende des Experiments. Tiere, die erkranken werden, zeigen bereits vor Krankheitsinduktion eine höhere Expression von CD69 als Tiere, die gesund bleiben werden. Die nachgewiesene mRNA kann keiner Zellpopulation nachgewiesen werden. Nach Krankheitsinduktion ist der Unterschied nicht mehr nachweisbar; die Expression liegt vor und nach Krankheitsinduktion in der gleichen Größenordnung (Daten nicht gezeigt). Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Test; *p < 0,05; (je n=6). 49
- 3.19 Zytokine und Zellmarker in Hautbiopsien vor Induktion der experimentellen EBA.** Zum Zeitpunkt der Biopsie sind alle Tiere klinisch gesund. Tiere, die nach der Krankheitsinduktion EBA-Symptome entwickeln werden, zeigen bereits vor der Krankheitsinduktion eine erhöhte Expression der proinflammatorischen Zytokine KC und TNF und des Zellmarkers CD11c (linke Spalte). Es zeigt sich eine positive Korrelation zwischen Expression und betroffener Körperoberfläche für CD11c (r=0,69; p<0,001) und KC (r=0,67; p<0,001;). Aus der Expression und dem klinischen Endpunkt kann mittels ROC-Analyse ein Schwellenwert für die einzelnen Parameter berechnet werden (rechte Spalte). Dieser Schwellenwert dient zur Berechnung der Likelihood Ratio (LR) und des positiv sowie negativ prädiktiven Wertes (PPW, NPW). Der PPW beträgt für alle dargestellten Gene >90% für Ergebnis "krank", der NPW >80%. (Darstellung als Mittelwert mit einfacher Standardabweichung. Vergleich mittels MANN-WHITNEY U-Test; *p < 0,05; (je n=6-18); PEARSON-Produkt-Moment Korrelation, lineare Darstellung; n=23; ROC-Kurven-Analyse) 51

Tabellenverzeichnis

1	Primärantikörper für immunhistochemische Färbungen.	19
2	Färbeprotokoll für immunhistochemische Anfärbung.*	20
3	Reaktionsansatz für die real-time RT PCR.*	24
4	Real-time RT PCR.*	24
5	Immunologische Parameter, die mittels real-time RT PCR auf mRNA-Ebene quantifiziert werden.*	25
6	Immunologische Parameter, die im gesamten Lymphknoten, in T- und B-Zell-Zone sowie Keimzentrum 10 Wochen nach Krankheitsinduktion quantifiziert werden.*	32
7	Immunologische Parameter, die im gesamten Lymphknoten, T-Zell Zone, B-Zell Zone und Keimzentrum 2 Wochen nach Krankheitsinduktion quantifiziert werden.*	47
8	Immunologische Parameter, die in peripheren Blutzellen 1 Woche vor sowie repetitiv nach Krankheitsinduktion quantifiziert werden.*	50
9	Immunologische Parameter, die in der Haut 1 Woche vor Krankheitsinduktion quantifiziert werden.*	50

* verweist auf die Legende jeder Tabelle auf der jeweiligen Seite.

Primer-Sequenzen

Ziel-Gen	Primer-Sequenz
MLN51 Sonde	5' CAC GGG AAC TTC GAG GTG TGC CTA AC
MLN51 for	5' CCA AGC CAG CCT TCA TTC TTG
MLN51 rev	5' TAA CGC TTA GCT CGA CCA CTC TG
AID for	5' CGT GGT GAA GAG GAG AGA TAG TG
AID rev	5' CAG TCT GAG ATG TAG CGT AGG AA
BAFF Sonde	5' CGC AAC GGA GAC GAC ACC TTC TTT GGT GCC C
BAFF for	5' CCT GCT ACT CGG CTG GCA TCG
BAFF rev	5' GGG GAT CAC GCA CTC CAG CA
C5aR for	5' GTG ATG GCT GTG GTC ATC TG
C5aR rev	5' TTG ATG TAG GCC AGG GAC AC
CD3 Sonde	5' CCA GAC TAT GAG CCC ATC CGC AAA GG
CD3 for	5' ATA GGA AGG CCA AGG CCA AG
CD3 rev	5' TCA GGC CAG AAT ACA GGT C
CD11c Sonde	5' CAA GAC CCA ACT AGG TGA CCT CCG
CD11c for	5' CCA CTG TCT GCC TTC ATA TTC
CD11c rev	5' GAC GGC CAT GGT CTA GAG
CD19 Sonde	5' CAA CCA GTT GGC AGG ATG ATG GAC TTC CT
CD19 for	5' GAA AAT GCA GAT GAG GAG CTG G
CD19 rev	5' GCT GCA TAG AGG ATC CCT CTC
CD69 for	5' TTC TCC ACC ACA ACC AAG AG
CD69 rev	5' AGC CCA ATC CAA TGT TCC AG
coll VII for	5' CCC AGA GAT AGA GTG ACC TGC
coll VII rev	5' CAG AGC CAA GTG TAT CCA GAC
CXCR5 for	5' CCT GCT GCT GGC CTG TAT AG
CXCR5 rev	5' CCA ACC TTG GCA AAG AGG AG
CXCL13 for	5' CAT AGA TCG GAT TCA AGT TAC GCC
CXCL13 rev	5' TCT TGG TCC AGA TCA CAA CTT CA

Fc γ RI Sonde	5' CAT CAC GGT GAA AGA GCT GTT TAC CAC
Fc γ RI for	5' GAA GAC ACC GCT ACA CAT CTG
Fc γ RI rev	5' GTC TCT GCA GGA GCA AAT TC
Fc γ RIIb Sonde	5' CAG GTT CCA GCT CTC CCA GGA AAC
Fc γ RIIb for	5' GTC GCA GCC ATT GTT ATT ATC C
Fc γ RIIb rev	5' GCT GTC TGT ACT CAC CTA CTT C
Fc γ RIII Sonde	5' CAT CAC TGT CCA AGA CCC AGC AAC TA
Fc γ RIII for	5' GTA CAC AGC ACC AGT CCA AG
Fc γ RIII rev	5' GCA AAC AGG AGG CAC ATC AC
Fc γ RIV Sonde	5' CTA GGC GAT CCA GGG TCT CCA TC
Fc γ RIV for	5' GAG GGC TCA TTG GAC ACA AC
Fc γ RIV rev	5' GTC CTA TCA GCA GGC AGA ATG
FoxP3 Sonde	5' CCG CCA CCT GGA AGA ATG CCA TCC G
FoxP3 for	5' ACT CGC ATG TTC GCC TAC
FoxP3 rev	5' TCC CTT CTC GCT CTC CAC TC
Gr-1 Sonde	5' ATT GTG GAC TCT CAC AGA AGC AAA GTC A
Gr-1 for	5' GCG TTG CTC TGG AGA TAG AAG
Gr-1 rev	5' CTT CAC GTT GAC AGC ATT ACC
IFN γ Sonde	5' TGC CAA GTT TGA GGT CAA CAA CCC ACA G
IFN γ for	5' GCA AGG CGA AAA AGG ATG C
IFN γ rev	5' GAC CAC TCG GAT GAG CTC ATT G
IL1 β Sonde	5' CAT CTT TGA AGA AGA GCC CAT CCT CTG TGA C
IL1 β for	5' CTT CCA GGA TGA GGA CAT GAG
IL1 β rev	5' CAC ACC AGC AGG TTA TCA TC
IL2 Sonde	5' CTT GCC CAA GCA GGC CAC AGA ATT G
IL2 for	5' TCC CCA GGA TGC TCA CCT TC
IL2 rev	5' ATG CCG CAG AGG TCC AAG
IL4 Sonde	5' CCT GGA TTC ATC GAT AAG CTG CAC CAT G
IL4 for	5' GAG ACT CTT TCG GGC TTT TCG
IL4 rev	5' AGG CTT TCC AGG AAG TCT TTC AG

IL6 for	5' CTC CCA ACA GAC CTG TCT ATA C
IL6 rev	5' GTG CAT CAT CGT TGT TCA TAC
IL10 Sonde	5' CTG AGG CGC TGT CAT CGA TTT CTC CC
IL10 for	5' TCC CTG GGT GAG AGC TGA AG
IL10 rev	5' CAC CTG CTC CAC TGC CTT G
IL 12 Sonde	5' CTC TAC GAG GAA CGC ACC TTT CTG GTT ACA C
IL12 for	5' GAG CAC TCC CCA TTC CTA CTT CTC
IL12 rev	5' TGC ATT GGA CTT CGG TAG ATG TC
IL12p35 Sonde	5' CAG TTT TTC TCT GGC CGT CTT CAC CAT GTC
IL12p35 for	5' TTT GGC CAG GGT CAT TCC AG
IL12p35 rev	5' GTC TTC AGC AGT GCA GGA ATA ATG
IL17 Sonde	5' CAC CCT GGA CTC TCC ACC GCA ATG AAG
IL17 for	5' TCA GAC TAC CTC AAC CGT TCC
IL17 rev	5' CTT TCC CTC CGC ATT GAC AC
IL18 for	5' GAC AAC TTT GGC CGA CTT CAC
IL18 rev	5' ACA GCC AGT CCT CTT ACT TCA
IL21 Sonde	5' CTG CAT GCT CAC AGT GCC CCT TTA CAT C
IL21 for	5' TCG CCT CCT GAT TAG ACT TCG
IL21 rev	5' GGC TTG AGT TTG GCC TTC TG
IL23p19 for	5' GTG AAG ATG GTT GTG ACC CAC
IL23p19 rev	5' GAT GTC AGA GTC AAG CAG GTG
IL27 p28 Sonde	5' CAG GCA TGG CAT CAC CTC TCT GAC TCT GAG
IL27 p28 for	5' CAT CTT CCC AAT GTT TCC CTG AC
IL27 p28 rev	5' GTG TGG TAG CGA GGA AGC AG
IL33 Sonde	5' CCA AGA GCA AGA CCA GGT GCT ACT ACG
IL33 for	5' GTG ATC AAT GTT GAC GAC TCT GG
IL33 rev	5' GGG ACT CAT GTT CAC CAT CAG
KC Sonde	5' CCT CGC GAC CAT TCT TGA GTG TGG CTA TGA C
KC for	5'-CAG ACC ATG GCT GGG ATT C
KC rev	5'-GAA CCA AGG GAG CTT CAG

Mac1 Sonde	5' CAG TTC AAC AAC CTG GGC CAG AGG
Mac1 for	5' CTT CAC GGC TTC AGA GAT GAC
Mac1 rev	5' CTG AAC AGG GAT CCA GAA GAC
MIP1 α Sonde	5'CCA TAT GGA GCT GAC ACC CCG ACT GC
MIP1 α for	5' CAC TCT GCA ACC AAG TCT TC
MIP1 α rev	5' CAC CTG GCT GGG AGC AAA G
RANTES Sonde	5' CAA ACA CGA CTG CAA GAT TGG AGC AC
RANTES for	5' GCT GCT TTG CCT ACC TCT CC
RANTES rev	5' CAC ACT TGG CGG TTC CTT CG
RGS 16 Sonde	5' CCA CCA AAC TGG CGT CCA GGG CTC ACC A
RGS 16 for	5' CAC CTG CCT GGA GAG AGC CA
RGS 16 rev	5' GGG GCT TCG CTG CGG ATG TA
ROR γ t Sonde	5' CCT CTA CCC CGA CAT TCC CAA GGA GGA GGC
ROR γ t for	5' GGC CCC ACA GAG ACA CCA CC
ROR γ t rev	5' TGC GGC GGA AGA AGC CCT TG
TGF β Sonde	5' CAC AGT ACA GCA AGG TCC TTG CCC TCT ACA
TGF β for	5' GAC CCT GCC CCT ATA TTT GGA G
TGF β rev	5' GCG ACC CAC GTA GTA GAC GAT G
TNF Sonde	5' CTG TAG CCC ACG TCG TAG CAA ACC AC
TNF for	5' CCC TCA CAC TCA GAT CAT CTT CTC
TNF rev	5' TGG CTC AGC CAC TCC AG
Lt β for	5' GGG AAC CAG AAA CTG ACC TCA A
Lt β rev	5' CCC TTG CCC ACT CAT CCA

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Jürgen Westermann, der mir dieses spannende Thema für meine Doktorarbeit überlassen und mich auf dem Weg zu dieser Dissertation hervorragend unterstützt und beraten hat. Diese Unterstützung beinhaltete neben der materiellen Ausstattung für die Experimente auch die konkrete Planung und Auswertung der Versuche sowie die Arbeit an den Versuchstieren. Hierbei möchte ich die Operationen an lebenden Mäusen im Besonderen erwähnen und mich bedanken, da sie aus meiner Sicht ein spezielles Merkmal der vorliegenden Arbeit sind. Des Weiteren möchte ich Dr. rer. physiol. Katja Bieber und Dr. rer. nat. Kathrin Kalies für die guten Ideen und die Betreuung meines Promotionsvorhabens danken, das ohne ihre verlässliche Unterstützung in Planung, Durchführung und Auswertung in dieser Weise nicht hätte durchgeführt werden können. Allen Doktoranden des Instituts für Anatomie, mit denen ich während meines Promotionsvorhabens zusammenarbeiten durfte, sei an dieser Stelle herzlich gedankt für die alltägliche Hilfe und den Spaß, den ich durch sie am wissenschaftlichen Arbeiten für mich entdeckt habe. Zudem möchte ich mich bedanken bei Lidija Gutjahr, Marie-Luise Leppin, Karola von Lingelsheim, Petra Lau und Kathy Budler, die mir den Einstieg in die Methoden meiner Doktorarbeit durch kompetentes und geduldiges Lehren erleichterten und so den Erfolg dieser Arbeit in nicht zu unterschätzendem Maß garantieren konnten.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Ralf Ludwig und Dr. med. Michael Kasperkiewicz aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie des UKSH, Campus Lübeck, herzlich bedanken für ihre materielle und methodische Unterstützung sowie weitere intellektuelle Anreize, die ich dank ihrer Anregungen in meiner Arbeit verfolgen konnte.

Aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck möchte ich Prof. Dr. rer. hum. biol. Inke R. König und Dr. rer. hum. biol. Claudia Hemmelmann für die statistische Beratung und die Auswahl geeigneter Verfahren danken, was mir die Auswertung meiner Daten wesentlich erleichterte.

Bei Uwe Heitmann (Zeitungsgruppe Ostfriesland) möchte ich mich sehr herzlich bedanken für das Redigieren meiner Dissertation, wodurch die formale Qualität der vorliegenden Arbeit deutlich gesteigert werden konnte.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich auf dem langen Weg zu dieser Dissertation in jeder erdenklichen Weise unendlich unterstützt hat. Danke!

Lebenslauf



Persönliche Daten

Name: Ellebrecht
 Vorname: Christoph Thomas
 Geburtstag: 30.04.1985
 Geburtsort: Lübeck
 Staatsangehörigkeit: Deutsch
 Ausbildung:
 Schulbildung: 1.-4. Klasse: Grundschule Lauerholz, Lübeck (1991-1995)
 5.-13. Klasse: Katharineum zu Lübeck, Lübeck (1995-2004)
 Schulabschluss: Abitur, Note: 1,0
 Bestenpreis der Schule
 Zivildienst: Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, UKSH,
 Campus Lübeck (2004-2005)
 Studium: Studium der Humanmedizin
 Universität zu Lübeck (2005-2011)
 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,0 (2007)
 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,0 (2011)
 Dissertation am Institut für Anatomie der Universität zu
 Lübeck: „*In-vivo*-Untersuchung zur Vorhersagbarkeit der
 Epidermolysis bullosa acquisita im Tiermodell“ (Beginn:
 August 2008)
 Famulaturen / Praktisches Jahr: Medizinische Klinik II, UKSH, Campus Lübeck (2008)
 Klinik für Neurologie, UKSH, Campus Lübeck (2009)
 Klinik für Augenheilkunde, UKSH, Campus Lübeck (2009)
 Klinik für Radiologie, UKSH, Campus Lübeck (2009)
 Department of Endocrinology and Diabetes, University
 Hospitals Coventry and Warwickshire, Coventry, UK (2010)
 Klinik für Orthopädische Chirurgie, Kantonsspital Sankt
 Gallen, Schweiz (2010)
 Stipendien: Studienstiftung des deutschen Volkes (seit 2006)
 Promotionsstipendium „Exzellenzmedizin“, Universität zu
 Lübeck (2009-2010)

Publikationen / Preise

1. **Christoph T. Ellebrecht**, Katja Bieber, David Banczyk, Kathrin Kalies, Christoph M. Hammers, Detlef Zillikens, Ralf J. Ludwig, and Jürgen Westermann. The outcome of experimental epidermolysis bullosa acquisita is governed by cutaneous inflammatory state in health. *in preparation*, Manuskript liegt bei.
2. Christoph M. Hammers, Katja Bieber, David Banczyk, Kathrin Kalies, **Christoph T. Ellebrecht**, Saleh M. Ibrahim, Detlef Zillikens, Ralf J. Ludwig, and Jürgen Westermann. Complement-fixing anti-type VII collagen antibodies are induced in Th1-polarized lymph nodes of EBA-susceptible mice. *J Immunol* 2011 187:5043-5050
3. David Banczyk, **Christoph T. Ellebrecht**, Ralf J. Ludwig, Detlef Zillikens, Jürgen Westermann, and Katja Bieber. Modulation of experimental Epidermolysis bullosa acquisita towards an improved phenotype by initiating the production of non-pathogenic autoantibodies. 37th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF) Luebeck, Germany - February 18-20, 2010 (Posterbeitrag, Abstract unter http://www.adf-online.de/src/adf/adf_abstracts_2010.pdf , (Zugriffsdatum: 01.08.2011))
4. **Christoph T. Ellebrecht**, Katja Bieber, and Jürgen Westermann. Das Immunsystem der Feind in Dir? Dritter Lübecker Doktorandentag 2009 (Posterbeitrag, Poster unter http://www.medizin-vor-2011.uni-luebeck.de/pdf/studierende/UniImDialogPoster2009/Poster%20-%20C_Ellebrecht2009.pdf (Zugriffsdatum: 01.08.2011))
5. Posterpreis beim Dritten Lübecker Doktorandentag der Universität zu Lübeck, 2009 (Beitrag siehe unter 3.)

Landesamt für soziale Dienste
Schleswig-Holstein

ZEUGNIS

über die Ärztliche Prüfung

Der Studierende der Medizin
Christoph Thomas Ellebrecht,
geboren am 30. April 1985 in Lübeck,
hat den schriftlichen Teil des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
am 6. Oktober 2011 in Lübeck
mit der Note - sehr gut -
und den mündlich-praktischen Teil des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
am 25. Oktober 2011 in Lübeck
mit der Note - sehr gut - abgelegt.
Er hat den
Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
mit der Note - sehr gut (1,0) -
am 25. Oktober 2011 bestanden.
Unter Berücksichtigung der Prüfungsnoten für den Ersten Abschnitt der Ärztlichen
Prüfung hat er die
Ärztliche Prüfung
mit der Gesamtnote - sehr gut (1,00) -
am 25. Oktober 2011 bestanden.
Er hat im Studium vor dem Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung das Wahlfach
„Molekularbiologie und Therapie endokriner Erkrankungen“
mit der Note - sehr gut - abgeschlossen.
Herr Christoph Thomas Ellebrecht hat das Medizinstudium an der
Universität zu Lübeck
abgeschlossen.



Handwritten signature and blue stamp.



Approbationsurkunde

Herr **Christoph Thomas Ellebrecht**

geboren am 30. April 1985 in Lübeck

erfüllt die Voraussetzungen des § 3 der Bundesärzteordnung.

Mit Wirkung vom heutigen Tage wird ihm die

Approbation als Arzt

erteilt.

Die Approbation berechtigt den Arzt zur Ausübung des ärztlichen Berufs.

Kiel, den 7. November 2011

Landesamt
für soziale Dienste
Schleswig-Holstein

Heim





Universität zu Lübeck
Institut für Sozialmedizin

Bescheinigung

über die Teilnahme an der Veranstaltung:

Bezeichnung: **„Suchen, Finden, Vorbereiten einer Dissertation“
(Zentrales Doktorandenseminar)**

abgeleistet an der Universität/Fakultät: **Lübeck**

Name, Vorname: **Ellebrecht, Christoph**

Geburtsdatum: **30.04.1985**

Geburtsort: **Lübeck**

hat im

Sommerhalbjahr

Winterhalbjahr

vom: 5. November 2007

bis: 11. Februar 2008

an der genannten Unterrichtsveranstaltung regelmäßig teilgenommen.

Lübeck,
Ort

11. Februar 2008
Datum



[Handwritten Signature]
Unterschrift der verantwortlichen Lehrkraft



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 Thomas Ellebrecht 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 (Kohlendioxid, 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.: DE218618948

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 50 09 | 24062 Kiel

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

Ihr Antrag vom: 08.02.2008
mit Ergänzung vom 21.04.2008
Mein Zeichen: V 312-72241.122-1 (19-2/08)

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

23/5/08

16. Mai 2008

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrte Frau Dr. Bieber,

gemäß § 8 Abs. 1 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), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

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

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 444 Mäuse verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Mai 2010 befristet.
Sie kann auf formlosen, hinreichend begründeten Antrag um ein Jahr verlängert werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen eingetreten sind.
3. Leiterin des Versuchsvorhabens:
Frau Dr. Katja Bieber

- 2 -

4. Ihr Stellvertreter:
Herr Prof. Dr. Jürgen Westermann
5. Wechselt die Leiterin des Versuchsvorhabens oder ihr Stellvertreter, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
6. Verantwortlicher Tierarzt nach § 9 Abs. 2 Nr. 8 Tierschutzgesetz:
Herr Dr. R. Noël
7. Weitere Nebenbestimmungen:
Keine.

Die Bestimmungen der §§ 8, 9 und 9a Tierschutzgesetz sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVBl. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten.

Ich weise insbesondere darauf hin, dass Tierversuche nur durch den in § 9 Abs. 1 Tierschutzgesetz genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Zustellung schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle Klage beim Verwaltungsgericht Schleswig-Holstein in 24837 Schleswig, Brockdorff-Rantzau-Straße 13, erhoben werden.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Irmer

Dr. Irmer

Erklärung

Ich versichere, die vorliegende Dissertation vorher oder gleichzeitig andernorts weder vorgelegt, noch einen Zulassungsantrag zum Promotionsverfahren gestellt zu haben.

Ich habe mich vorher keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen.

Ich widerspreche der Zulassung von Zuhörerinnen oder Zuhörern bei der mündlichen Prüfung nicht.

Christoph Thomas Ellebrecht,

Lübeck 2011