Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften

Programmbereich Asthma und Allergie
Leitung: Prof. Dr. Heinz Fehrenbach
Forschungsgruppe Biochemische Immunologie
Leitung: Prof. Dr. Frank Petersen

Die Beteiligung von Mastzellen in der Autoimmunerkrankung Epidermolysis bullosa acquisita

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Anika Kasprick
aus Schwedt/Oder

Lübeck 2013

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Herr Prof. Dr. rer. nat. Frank Petersen
2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Herr Prof. Dr. rer. nat. Enno Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 09.10.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis IX

1. Einleitung 1

1.1 Der Aufbau der Haut 1

1.2 Epidermolysis bullosa acquisita - eine blasenbildende Autoimmundermatose .. 3

1.2.1 Definition, Prävalenz und Symptome der EBA 3

1.2.2 Das Autoantigen Kollagen Typ VII 4

1.2.3 Verfahren zur Diagnose einer EBA 5

1.2.4 Therapieansätze zur Behandlung einer EBA 6

1.2.5 Experimentelle Modelle der EBA 7

1.2.6 Pathomechanismen der experimentellen EBA 8

1.3 Mastzellen 10

1.3.1 Charakterisierung von Mastzellen 10

1.3.2 Rezeptoren und Stimuli der Mastzellen 11

1.3.3 Wirkungsweise der Mastzellen und ihre Beteiligung an immunologischen Prozessen 12

1.3.4 Mastzell-defiziente Mausstämme 14

1.3.5 Mastzellen in chronischen Erkrankungen 15

1.4 Ziel der Arbeit 17

2. Material und Methoden 19

2.1 Material 19

2.1.1 Antikörper 19

2.1.2 Enzyme, Inhibitoren, Stimuli 20

2.1.3 Primersequenzen 20

2.1.4 Reagenzien 21

2.1.5 Fertig-Reagenzsätze 22

2.1.6 Geräte 22

2.1.7 Verbrauchsmaterialien 24

2.1.8 Mausstämme 24

2.2 Isolierung und Kultur von Zellen 25

2.2.1. Isolierung von Bindegewebs-Mastzellen aus humaner Haut (Hautmastzellen) 25

2.2.2 Stimulation humaner Hautmastzellen *in vitro* 27

2.2.3 Isolierung von neutrophilen Granulozyten aus humanem Vollblut 27

2.3 Nachweisverfahren der Zellaktivierung 28

2.3.1 Bestimmung der relativen Menge freigesetzter β-Hexosaminidase in Mastzellkultur-Überständen 28

2.3.2 Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten auf Mastzellkultur- Überständen 28

2.4 Immunfluoreszenzanalytische Verfahren 31

2.4.1 Färbung von Oberflächenmolekülen für die Durchflusszytometrie 31

2.4.2 Quantifizierung von Zytokinen im Serum 32

2.5 Molekularbiologische Methoden 33

2.5.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus stimulierten humanen Hautmastzellen 34

2.5.2 Messung der RNA-Qualität und -Quantität 34

2.5.3 RNA-Genexpressionsanalyse durch DNA-Microarrays (Durchführung durch Kooperationspartner in München) 35

2.5.4 Genotypisierung der Cre/iDTR-Mäuse 36

2.6 Tierexperimentelle Verfahren 37

2.6.1 Depletion der Bindegewebs-Mastzellen in den *Mcpt5-Cre iDTR*-Mäusen 37

2.6.2 Induktion einer passiven, systemischen EBA 38

2.6.3 Induktion einer passiven, lokalen EBA 39

2.6.4 Bestimmung der Ödembildung in der lokalen EBA 41

2.6.5 Bestimmung des klinischen Schweregrades der Erkrankung 42

2.7 Histologische Methoden 42

2.7.1 Paraffin-Gewebeschnitte 42

2.7.2 Kryo-Gewebeschnitte 43

2.7.3 Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase Färbung 43

2.7.4 Histologische Bestimmung der Mastzellzahl 44

2.7.5 Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung 44

2.8 Statistik 45

3. Ergebnisse 47

3.1 Untersuchungen zur Aktivierung humaner Hautmastzellen in der EBA *in vitro* 47

3.1.1 Humane Hautmastzellen exprimieren CD32 auf ihrer Zelloberfläche 47

3.1.2 Aktivierung von humanen Hautmastzellen durch Immunkomplexe und Komplementfaktoren 49

3.2. Experimentelle EBA in Mastzell-defizienten Mäusen 56

3.2.1 Experimentelle EBA in Mauslinien mit konstitutiver Mastzelldefizienz 56

3.2.2 Experimentelle EBA in Mäusen mit konditionaler Mastzelldefizienz 61

3.2.3 Suszeptibilität der drei Mausstämme gegenüber dem pathogenen Antikörper im Vergleich 64

3.2.4 Histologische Analyse der experimentellen EBA in Mastzell-defizienten Mäusen 65

3.2.5.Zytokinspiegel und neutrophile Granulozyten in der experimentellen EBA 70

3.2.7 Aktivierung der Mastzellen im lokalen Modell der EBA 73

3.2.8 Die Rolle von Mastzellen im lokalen Modell der EBA 78

4. Diskussion 83

5. Zusammenfassung 97

Anhang XI

Literaturverzeichnis XVII

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	**Abb**ildung
AK	**A**nti**k**örper
AUC	**a**rea **u**nder the **c**urve; *Integral der Kurve*
amCOL7	**a**nti-**m**urines **Kol**lagen **VII**-IgG
BGMZ	**B**inde**g**ewebs-**M**ast**z**ellen
bp	**B**asen**p**aar
BP	**b**ullöses **P**emphigoid
CCL	Chemokin (**C-C**-Motiv) **L**igand
CD	**C**luster of **d**ifferenciation
Cre/iDTR	*Mcpt5-Cre iDTR*; konditionaler Mastzell-defizienter Mausstamm
DC	**d**endritic **c**ell; *dendritische Zelle*
DEJ	**d**ermal-**e**pidermale **J**unktionszone
DT	**D**iphtherie**t**oxin
DTR	**D**iphtherie**t**oxin-**R**ezeptor
EAE	**e**xperimentellen **A**utoimmun**e**nzephalomyelitis
EBA	**E**pidermolysis **b**ullosa **a**cquisita
ELISA	**E**nzyme-**l**inked **I**mmuno**s**orbent **A**ssay
FcεRI	**Fcε-R**ezeptor **I**; *hoch-affiner IgE-Rezeptor*
FcγR	**Fcγ-R**ezeptor; *IgG-Rezeptor*
fMLP	N-**f**ormyl-L-**m**ethionyl-L-**l**eucyl-L-**P**henylalanin
FSC	**F**orward **sc**atter; *Vorwärtsstreulicht*
geom. MW	**geom**etrischer **M**ittel**w**ert
G-CSF	**g**ranulocyte-**c**olony **s**timulating **f**actor; *Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor*
GM-CSF	**g**ranulocyte **m**acrophage-**c**olony **s**timulating **f**actor; *Granulozyten-Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor*
H&E	**H**ämatoxylin und **E**osin-Färbung
HLA	**h**umanes **L**eukozyten-**A**ntigen
i.d.	**i**ntra**d**ermal
IFN	**I**nter**f**ero**n**
Ig	**I**mmun**g**lobulin
IL	**I**nter**l**eukin
i.p.	**i**ntra**p**eritoneal
i.v.	**i**ntra**v**enös
KG	**K**örper**g**ewicht

LTB_4	**L**eukot**r**ien **B_4**
LTC_4	**L**eukot**r**ien **C_4**
mCOL7	**m**urines **Kol**lagen **VII**
MCP	**m**ast **c**ell **p**rotease; *Mastzellprotease*
MPO	**M**yelo**p**er**o**xidase
MS	**M**ultiple **S**klerose
MW	**M**ittel**w**ert
ns	**n**icht **s**ignifikant
PBS	**P**hosphate **b**uffered **s**aline; *Phosphatgepufferte Salzlösung*
PBS-D	**P**hosphate **b**uffered **s**aline nach **D**ulbecco
PCR	**P**olymerase **c**hain **r**eaction; *Polymerase-Kettenreaktion*
PGD_2	**P**rosta**g**landin **D_2**
PMN	**p**oly**m**orph **n**uclear cell; *polymorph-nukleäre Zelle*
RA	**R**heumatoide **A**rthritis
RIN	**R**NA **I**ntegrity **N**umber; *RNA-Integritätszahl*
RPMI	**R**oswell **P**ark **M**emorial **I**nstitute
RT	**R**aum**t**emperatur
s.c.	**s**ub**c**utan
SCF	**s**tem **c**ell **f**actor; *Stammzellfaktor*
SD	**S**tandard **D**eviation; *Standardabweichung*
SSC	**s**ide **sc**atter; *Seitwärtsstreulicht*
Tab	**Tab**elle
TGF	**T**issue **g**rowth **f**actor; *Gewebewachstumsfaktor*
TLR	**T**oll-**l**ike **R**ezeptor
TMB	**T**etra**m**ethyl**b**enzidin
ü.N.	**ü**ber **N**acht
W-sh	C57BL/6J *$Kit^{W\text{-}sh/\mathbf{W\text{-}sh}}$*; konstitutiver Mastzell-defizienter Mausstamm
WT	**W**ild**t**yp
W/W-v	$WBB6F_1$/J *$Kit^{\mathbf{W/W\text{-}v}}$*; konstitutiver Mastzell-defizienter Mausstamm

1. Einleitung

Das Immunsystem besteht aus einem komplexen Netzwerk aus Organen, Zellen und biologisch aktiven Molekülen mit der Funktion, die Integrität des Organismus aufrecht zu erhalten. Diese Unversehrtheit wird in der Regel durch äußere Faktoren wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten bedroht. Unter bestimmten Bedingungen können aber auch innere Faktoren vom Immunsystem als Gefahr wahrgenommen werden und Autoimmunreaktionen verursachen. Dabei richtet sich die Immunantwort gegen körpereigene Strukturen, die unter physiologischen Bedingungen toleriert werden. Der Verlust dieser Toleranz wird als Autoimmunität bezeichnet und die Zielstrukturen als Autoantigene. Bei Autoimmunerkrankungen der Haut stellen vor allem Strukturmoleküle der verschiedenen Hautschichten Autoantigene dar.

1.1 Der Aufbau der Haut

Unsere Körperoberfläche, die Haut, schützt uns vor Einflüssen und Pathogenen aus der Umgebung. Dieses lebenswichtige Organ setzt sich aus drei Hauptschichten zusammen: der Epidermis, der Dermis und der Hypodermis, wobei letztere die oberen Schichten mit den darunter liegenden Organen verbindet (**Abb. 1.1**).

Die Epidermis repräsentiert die äußerste Hautschicht und besteht hauptsächlich aus Keratinozyten und zu einem geringen Anteil aus Melanozyten, Merkel-Zellen und Langerhans-Zellen. Sie lässt sich morphologisch in drei Zonen unterteilen. Die äußerste Zone stellt das Stratum granulosum dar. Darunter liegt das Stratum spinosum, in dem zahlreiche Desmosomen die Zellen untereinander verbinden und so für deren festen Zusammenhalt sorgen. Das Stratum basale ist die innerste Zone der Epidermis und sitzt der Basalmembran, der Grenzschicht zwischen Epidermis und Dermis, direkt auf. Dabei sind die Keratinozyten des Stratum basale mittels Hemidesmosomen fest mit der Basalmembran verankert.

Die zweite und damit mittlere Schicht der Haut ist die Dermis. Sie besteht hauptsächlich aus Bindegewebe und enthält Haarfollikel, verschiedene Drüsen und Gefäße. Sie setzt sich aus zwei Zonen zusammen. Die äußere Zone, das Stratum papillare, liegt dünn unter der Epidermis und der Basalmembran und ist aus lockerem Bindegewebe mit Fibroblasten, Mastzellen und Makrophagen aufgebaut. Ihr schließt sich die innere Zone der Dermis, das Stratum reticulare, an, welches ein zellarmer aber fasernreicher Bereich ist, der vor allem Kollagene, wie Kollagen Typ I und VII, und Elastinfasern enthält. Die Fasern dieser Zone durchziehen auch das Stratum papillare und verbinden sich mit den Hemidesmosomen und

Fasern der Basalmembran. Somit stellt die Dermis mit ihren zahlreichen Fasern wichtige Ankerstrukturen für die Epidermis zur Verfügung.[1]

Eine bereits genannte, wichtige Komponente für die Stabilität und den Zusammenhalt der Hautschichten stellt die Basalmembran dar. Sie setzt sich aus der Lamina lucida, Lamina densa und Sublamina densa zusammen und verbindet die epidermale fest mit der dermalen Hautschicht, weshalb sie auch als dermal-epidermale Junktionszone (DEJ) bezeichnet wird. Die Lamina lucida enthält hauptsächlich Laminin, extrazelluläre Anteile von Hemidesmosomen der Keratinozyten, Ankerfibrillen und Adhäsionsmoleküle. Darunter liegt mit der Lamina densa der zentrale Teil der Basalmembran, der aus einem geflechtartigen Netzwerk aus Kollagen IV zusammen mit Proteoglykanen, Laminin und Fibronektin aufgebaut ist. Dieses Geflecht ermöglicht vielfältige Verbindungen der Lamina densa mit anderen Strukturen der Haut, wie den aus dem Stratum reticulare einstrahlenden Fasern und den Anker- und Adhäsionsmolekülen der Lamina lucida und der Sublamina densa. Durch letztere Schicht ist die Basalmembran mit dem darunterliegenden Bindegewebe verbunden und gibt der Haut ihre strukturelle Stabilität.[2] Neben den Desmosomen als Zell-Zell-Verbindungen in der Epidermis und den zahlreichen Fasern, Ankerfibrillen und Hemidesmosomen als Zell-Matrix-Kontakte in der Dermis stellt die Basalmembran somit eine essenzielle Komponente für die Integrität der Haut dar. Diese, die Stabilität und den Zusammenhalt der Haut tragenden Verbindungen, bilden gleichzeitig Ziele für eine Reihe von autoreaktiven Antikörpern, deren Ablagerung sich in blasenbildenden Autoimmundermatosen manifestieren kann.

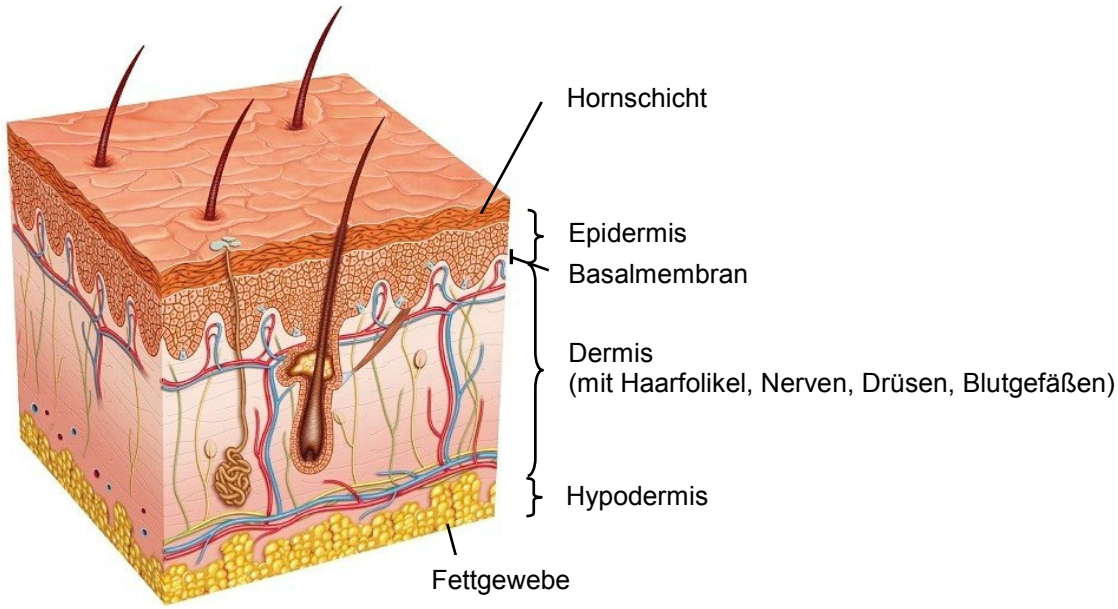


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau der Haut (Ref. [3], modifiziert)

Dargestellt ist die humane Haut im Querschnitt und deren schematischer Aufbau. Es sind die drei Hauptschichten Epidermis, Dermis und Hypodermis zu erkennen sowie Haarfollikel, Drüsen, Blutgefäße und Nervenbahnen in der dermalen Schicht. Die Basalmembran ist als dünne Schicht zwischen Epidermis und Dermis angezeigt.

1.2 Epidermolysis bullosa acquisita - eine blasenbildende Autoimmundermatose

Bullöse Autoimmundermatosen stellen eine Gruppe von schwerwiegenden, langandauernden und lebensbedrohlichen Erkrankungen der Haut dar, die durch Blasenbildung und Läsionen der Haut- und Schleimhaut-Membranen charakterisiert sind. Typischerweise werden diese Erkrankungen durch gewebespezifische Autoantikörper vermittelt, anhand deren Spezifität zwei wesentliche Gruppen von Krankheiten unterschieden werden können. Antikörper gegen Strukturen der Zelloberfläche epidermaler Keratinozyten, sogenannte desmosomale Proteine, bilden die Pemphigus-Erkrankungen, wozu Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus (Antigene sind Desmogleine 1 und 3)[4,5] gehören. Diesen stehen die Pemphigoid-Erkrankungen gegenüber, wie das bullöse Pemphigoid (BP) und Epidermolysis bullosa acquisita (EBA), bei denen Immunglobuline gegen Strukturen der Basalmembran (die hemidesmosomalen Proteine) und Ankerfibrillen gerichtet sind.[6]

1.2.1 Definition, Prävalenz und Symptome der EBA

Epidermolysis bullosa acquisita wurde zum ersten Mal im Jahre 1895 beschrieben[7] und zählt zu den erworbenen blasenbildenden Autoimmunerkrankungen der Haut und Schleimhaut. Sie ist immunologisch durch zirkulierende und gewebebindende Autoantikörper charakterisiert, die spezifisch ihr Autoantigen, das Kollagen Typ VII, binden und subepidermale Blasen verursachen. Damit grenzt sie sich von dem klinisch nahe verwandten bullösen Pemphigoid (BP) ab, bei dem die Autoantikörper gegen die hemidesmosomalen Proteine BP180 und BP230 gerichtet sind.[8] EBA ist eine chronisch verlaufende und organspezifische Erkrankung, die mit einer Prävalenz von 0,2 Fällen pro Million Menschen und Jahr die seltenste bullöse Autoimmundermatose darstellt und somit fünf- bis zehnmal weniger auftritt als die häufigste blasenbildende Autoimmunerkrankung, das bullöse Pemphigoid. Die Erkrankung bricht in der Regel im Alter von 40 bis 60 Jahren aus, betrifft im Ausnahmefall aber auch Kinder[9–11], und ist unter den ethnischen Gruppen und Geschlechtern gleichverteilt.[12,13] Allerdings konnte in EBA-Patienten ein erhöhtes Auftreten des humanen Leukozyten-Antigens (HLA)-DR2 nachgewiesen werden.[14–16]

Patienten mit einer EBA leiden unter fragiler Haut, die sich bereits bei leichter Beanspruchung löst, wodurch pralle, mit Flüssigkeit gefüllte, subepidermale Blasen entstehen. Das Aufplatzen dieser Blasen verursacht Hautläsionen und großflächige Ablösungen der Epidermis, die zunächst verkrusten, sich entzünden können und anschließend langsam und schwer unter Narben- und Milienbildung heilen.[17]

Die erworbene EBA kann anhand ihres Phänotyps in eine klassische, nicht-entzündliche Form, die mechanobullöse EBA, und eine entzündliche Form, die inflammatorische EBA, unterteilt werden. Bei der mechanobullösen EBA treten die Läsionen besonders an Körperstellen mit wiederholten kleinen Traumata auf, also vor allem an der Außenseite von Gliedmaßen, sind aber auch auf den mukosalen Oberflächen zu finden. Im Vergleich dazu entwickeln Patienten mit einer entzündlichen EBA Blasen am gesamten Körper, also sowohl an verletzungsanfälligen wie auch Trauma-geschützten Stellen und leiden unter juckenden, roten Arealen der Haut. Außerdem zählen Vernarbungen, Nageldystrophien und Haarverlust am Kopf zu den klinischen Symptomen beider Formen der EBA.[18,19]
Hinsichtlich der Beteiligung der oralen Schleimhäute, der Zeit bis zur Remission, also dem Verschwinden der Symptome, und der Serumtiter der Autoantikörper unterscheiden sich die mechanobullöse und entzündliche Form der EBA nicht voneinander.[13]

1.2.2 Das Autoantigen Kollagen Typ VII

Das Autoantigen der EBA, Kollagen Typ VII, wird von dem Gen *COL7A1* kodiert, welches sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 befindet.[20] Das Genprodukt, Kollagen Typ VII-Protein, ist ein homopolymeres, helikales, aus drei α-Ketten aufgebautes Molekül[21] (**Abb. 1.2**), das aus einer kollagenen Domäne und zwei, an deren Enden befindlichen nicht-kollagenen Domänen (NC) besteht: die NC1 am N-Terminus (~145 kDa) und die NC2 am C-Terminus (~34 kDa).[20,22,23]

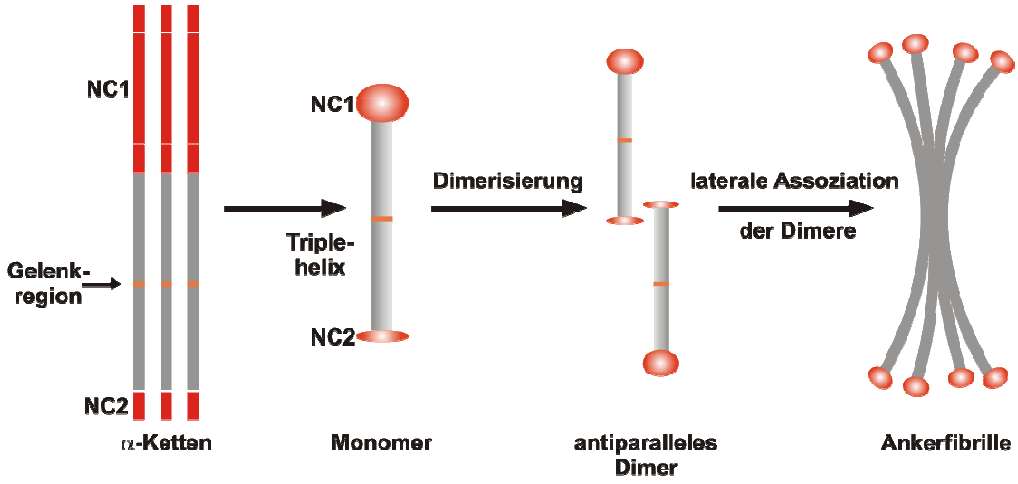


Abb. 1.2: Aufbau der Kollagen Typ VII-Ankerfibrillen (Ref. [24] , modifiziert)
Drei identische kollagene α-Ketten (mit einer Gelenkregion) bilden ein helikales Molekül mit einer nicht-kollagenen (NC) 1-Domäne am Amino-Ende und einer NC2-Domäne am Carboxyl-Ende. Durch Überlagerung der Carboxyl-Enden, und Bildung von Disulfidbrückenbindungen[25] im Überlappungsbereich entsteht ein anti-paralleles Dimer. Eine größere Anzahl dieser Dimere lagert sich im Gewebe lateral aneinander und bildet eine Ankerfibrille des Kollagen Typ VII.

Die Ankerfibrillen des Kollagen VII werden aus einer großen Anzahl parallel, nicht versetzt angeordneter, dimerer Kollagen Typ VII-Moleküle geformt (**Abb. 1.2**) und sind anhand ihrer charakteristischen Biegung in der dermal-epidermalen Basalmembran gut zu lokalisieren. Die Produktion dieser Moleküle wird von den Epithelzellen und Fibroblasten übernommen.[26,27]

Kollagen Typ VII ist strukturelle Hauptkomponente der Ankerfibrillen in Lamina densa und Sublamina densa[28] der Basalmembran von mehrschichtigen Epithelien, wodurch dieses Ankermolekül in Haut, Schleimhaut, Kanälen der Prostata und Brust, Trachea, Bronchien, Cornea und Oesophagus zu finden ist. Hingegen konnte bisher kein Typ VII Kollagen im Gastrointestinaltrakt, um Blutgefäße, Muskeln und Nervenfasern nachgewiesen werden.[26,29]

Die Ankerfibrillen des Kollagen Typ VII erstrecken sich vom unteren Teil der Lamina densa zur oberen, papillären Dermis und sind mit den Anker-Plaques in dieser Schicht assoziiert.[30] Kollagen Typ VII kann dadurch über seine NC1-Domäne mit Kollagen Typ I, III und IV in der Basalmembran und den Anker-Plaques interagieren.[27] Auf diese Weise formen die Typ VII Kollagen-Fasern ein stabiles Geflecht, das für die Verankerung der Epidermis in der Dermis essenziell ist.

Kollagen Typ VII wurde kurz nach seiner Beschreibung als Autoantigen der EBA identifiziert, indem nachgewiesen werden konnte, dass Antikörper von EBA-Patienten in und direkt unterhalb der Lamina densa binden. Hierbei werden das 290 kDa große Kollagen Typ VII bzw. die 145 kDa große NC1-Domäne gebunden[28,31], die vom Großteil der EBA-Autoantikörper erkannt wird.[32,33] Nur ein kleiner Teil der EBA-Autoantikörper bindet Epitope in der NC2- oder kollagenen Domäne.[34–37]

1.2.3 Verfahren zur Diagnose einer EBA

Um die EBA von den anderen bullösen Autoimmundermatosen zu unterscheiden und eindeutig diagnostizieren zu können, wurden verschiedene Methoden entwickelt, die meist erst in ihrer Summe eine sichere Aussage zulassen.

Routinemäßig wird in periläsionalen Hautbiopsien der Patienten mithilfe der direkten Immunfluoreszenz die lineare Deposition von gebundenen Antikörpern der Klasse IgG und Komplementfaktor C3 entlang der DEJ nachgewiesen.[38] Die Immunelektronenmikroskopie erlaubt darüber hinaus die Bestimmung des genauen Bindungsorts der Autoantikörper in der Sublamina densa-Zone der Basalmembran und die Identifikation der Blasenbildung zwischen Lamina densa und Lamina lucida.[37,39]

Zirkulierende Autoantikörper im Blut von EBA-Patienten werden mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert, indem Patientenseren mit Salz-gespaltener Haut inkubiert werden und sich die Antikörper von EBA-Patienten an der dermalen Seite anlagern.[37,40,41]

Im Anschluss an die histologischen Untersuchungen erfolgt die Bestätigung der EBA-Diagnose durch den Nachweis der Autoantikörper-Spezifität gegen das 290 kDa-große Kollagen Typ VII-Protein (Immunoblot)[31] oder dessen NC1- und NC2-Domänen (Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISA). Die Sensitivität (≥ 91%) und die Spezifität (≥ 98%) des ELISAs liegen sehr hoch[42,43] und die Immunglobulin G-Titer korrelieren gut mit der Schwere der EBA.[44,45]

1.2.4 Therapieansätze zur Behandlung einer EBA

Um Patienten mit einer EBA zu heilen, gibt es bisher viele verschiedene Ansätze aber keine optimale Therapie. Da EBA oftmals eine refraktäre Erkrankung mit chronischem Verlauf ist, kommt den Betroffenen grundsätzlich eine unterstützende Versorgung und Beratung zur Vermeidung von Traumata und zur Handhabung der Wundheilung zu.

Die Behandlung mit systemischen Kortikosteroiden, z.B. hohe Dosen Methylprednisolon[13], wird oftmals als Haupttherapie eingesetzt. Diese verbessert jedoch meist nur unzureichend den Krankheitszustand der EBA-Patienten und geht zudem mit zahlreichen Nebenwirkungen einher.[18,43] Um die dramatischen gesundheitlichen Risiken zu reduzieren, werden Kortikosteroide häufig zusammen mit anderen immunsuppressiven Medikamenten wie Cyclosporin oder Azathioprin verabreicht.[46–48] Meist werden auch in Verbindung mit Kortikosteroiden Dapson oder Colchizin oral gegeben, welche jedoch ebenfalls zahlreiche Nebenwirkungen aufweisen.[49–51]
Neben diesen hauptsächlich eingesetzten Medikamenten wird seltener, besonders in schwer zu behandelnder EBA, die Therapie mit hoch-dosierten intravenösen Immunglobulinen (IVIG) angewandt[52,53]. Alternativ wird Rituximab[54–56], ein monoklonaler anti-CD20-IgG_1 Antikörper, zur Depletion von B-Zellen eingesetzt[57,58] oder eine Immunadsorption[59] der Autoantikörper durchgeführt.

Insgesamt ist EBA deutlich schlechter mit systemischen Kortikosteroiden zu behandeln als andere primäre blasenbildende Erkrankungen wie BP.[46] Dazu kommt, dass die verschiedenen Formen dieser Erkrankung unterschiedlich gut auf die beschriebenen Therapiemöglichkeiten reagieren, was eine einheitliche Therapie erschwert.[46,47]

1.2.5 Experimentelle Modelle der EBA

Ein Großteil der bisher erworbenen Erkenntnisse über die Entstehung und den Verlauf der EBA wurde mithilfe von experimentellen Modellen gewonnen, die *ex vivo*-, *in vitro*- und *in vivo*-Modelle umfassen.

In einem standardisierten *ex vivo*-Modell werden Gefrierschnitte humaner oder muriner Haut mit Antikörpern gegen Kollagen Typ VII und Leukozyten inkubiert und das Ausmaß der Separation von Dermis und Epidermis nach Hämatoxylin&Eosin-Färbung bestimmt. Dieses Modell eignet sich für die Untersuchung von Mechanismen und Zellen, die zur Blasenbildung in der EBA führen sowie für die Testung therapeutischer Potenziale von neuen Substanzen in der EBA-Therapie.

In einem anderen, simplifizierten Modell werden Immunkomplexe aus Kollagen Typ VII-Protein und anti-Kollagen Typ VII-IgG in Kulturplatten immobilisiert und diese dann Zellen *in vitro* angeboten. Deren Reaktion auf die Immunkomplexe kann auf zellulärer und molekularer Ebene analysiert werden und damit Aufschluss über ihre mögliche Beteiligung im Pathomechanismus der EBA liefern.

Mithilfe der *in vivo*-Modelle wird die Erforschung der EBA im lebenden Organismus ermöglicht. Hierbei wird in Mäusen auf verschiedene Weisen eine experimentelle EBA induziert. Im passiven Mausmodell der EBA erhalten Mäuse wiederholt anti-murines Kollagen Typ VII-IgG (amCOL7), das aus Seren mit rekombinantem murinen Kollagen Typ VII immunisierter Kaninchen gewonnen wird.[60,61] Vier bis fünf Tage nach der ersten Antikörper-Injektion entwickeln die Tiere bereits deutliche Symptome einer EBA (Blasenbildung, Schorf, Ablösung der Haut). Nach Absetzen des pathogenen Antikörpers heilen die Hautläsionen wieder aus. Um die Chronifizierung der Erkrankung und den Toleranzbruch, der zur Autoantikörper-Produktion führt, zu untersuchen, wird ein aktives Mausmodell verwendet.[62] Hier wird die Toleranz des Immunsystems gegen das körpereigene Kollagen Typ VII gebrochen, indem rekombinantes murines COL7C (immunodominantes Epitop innerhalb der NC1 des Kollagen Typ VII) zusammen mit einem Adjuvanz den Mäusen appliziert wird. Jedoch erwiesen sich bisher nur wenige Mausstämme wie beispielsweise die SJL/J-Mäuse als geeignet für dieses Modell.[63–65] Unter Verwendung verschiedener Krankheitsmodelle konnten bereits wesentliche Teile des Pathomechanismus der EBA aufgeklärt werden.

1.2.6 Pathomechanismen der experimentellen EBA

EBA ist eine Immunerkrankung, deren Pathogenese über Autoantikörper vermittelt wird. Dies wurde bestätigt, als mit dem Transfer von Seren aus EBA-Patienten auch die Übertragung der Blasenbildung und des Phänotyps der EBA einherging.[66] Allerdings ist bisher nicht genau verstanden, wie es zum Bruch der Eigentoleranz und damit zur Produktion von Autoantikörpern in EBA-Patienten kommt.

Studien konnten zeigen, dass eine gehäufte Präsenz des MHC-Klasse II-Moleküls HLA-DR2 in Patienten mit einer EBA auftritt[14–16] und dass die Induktion einer experimentellen EBA in Mäusen stark mit dem MHC-Haplotyp "H2s" assoziiert ist.[67] Diese Erkenntnisse und der Fund von Antigen-reaktiven T-Zellen in EBA-Patienten[68] sowie die Abwesenheit von Autoantikörpern in T-Zell-defizienten Nacktmäusen nach Immunisierung mit Kollagen Typ VII[69] deuten auf eine wesentliche Beteiligung von T-Zellen in der Induktion einer EBA hin. So erkennen autoreaktive T-Zellen Kollagen Typ VII, welches die Antigen-präsentierenden Zellen mittels HLA-DR2-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Die so aktivierten T-Zellen verhelfen dann in den sekundären lymphatischen Organen Antigen-präsentierenden B-Zellen zur Produktion von Autoantikörpern.[70] Warum autoreaktive T-Zellen den Prozess der negativen Selektion im Thymus passieren, ist Gegenstand weiterer Studien.

Nach ihrer Bildung zirkulieren die Autoantikörper im Organismus und bilden immobilisierte Immunkomplexe, indem sie spezifisch ihr Antigen, Kollagen Typ VII, in der DEJ der Basalmembran von Haut und Mukosa binden. Dabei können nur Antikörper, die spezifische Epitope des Typ VII Kollagens erkennen, eine Separation von Epidermis und Dermis induzieren.[67]

Beiden Formen der EBA liegen unterschiedliche Pathomechanismen zu Grunde. Da für die mechanobullöse EBA bisher kein experimentelles Tiermodell existiert, ist dieser Mechanismus weitgehend unbekannt. Allerdings wird vermutet, dass die Deposition der Autoantikörper eine Interaktion von Kollagen Typ VII mit anderen Matrixproteinen wie Kollagen Typ IV und Fibronektin beeinträchtigt oder die Formierung der dimeren Kollagen VII-Moleküle und deren Assemblierung zu Ankerfibrillen behindert. Dadurch nimmt die adhäsive Funktion der Basalmembran deutlich ab und Dermis und Epidermis sind nicht mehr fest miteinander verbunden, sodass es an beanspruchten Körperstellen leicht zur Blasenbildung kommt.[43] Währenddessen ist in der entzündlichen EBA das angeborene Immunsystem wesentlich am Pathomechanismus beteiligt, worauf nachfolgend eingegangen werden soll.

Die Autoantikörper von EBA-Patienten gehören hauptsächlich den IgG_1- und IgG_4-Subklassen an[71–74], während im murinen aktiven EBA-Modell neben IgG_1 vor allem IgG_{2a} und IgG_{2b} vorhanden sind.[62]

Gebundene Autoantikörper an der dermal-epidermalen Junktionszone vermitteln über ihr Fc-Fragment die Effektorfunktion und aktivieren die Kaskade des Komplementsystems über den alternativen Aktivierungsweg.[75] Dabei werden die Komplementkomponenten C3 und C5 proteolytisch gespalten, was zur Deposition der Komplementfaktoren C3b und C5b an der DEJ sowie zur Freisetzung der Anaphylatoxine C3a und C5a führt. Die Komplementaktivierung ist ein wesentlicher Schritt der EBA-Induktion, da die Anaphylatoxine C3a und C5a neutrophile Granulozyten rekrutieren und aktivieren.[61,76] Zusätzlich infiltrieren mononukleäre Zellen die betroffenen Hautregionen.[77] Die gebundenen Autoantikörper können über ihr Fc-Fragment von Fcγ-Rezeptoren (FcγR) der Neutrophilen gebunden werden, wodurch sie ebenfalls zur Aktivierung der Neutrophilen beitragen. Mithilfe des passiven EBA-Modells in Mäusen, denen verschiedene Fcγ-Rezeptoren fehlen, konnte gezeigt werden, dass bereits der Verlust des murinen FcγRIV auf Neutrophilen vor der Induktion einer EBA schützt.[78,79] Darüberhinaus konnte eine höhere FcγRIV-Expression in Mausstämmen nachgewiesen werden, die anfällig gegenüber der EBA-Induktion sind.[80]

Im Vergleich zu gesunden Menschen ist das Verhältnis von aktivierenden zu inhibierenden Fcγ-Rezeptoren in EBA-Patienten verändert, da C5a eine verstärkte Expression des aktivierenden FcγRIIIA und gleichzeitig eine reduzierte Expression des inhibierenden FcγRIIB auf humanen Neutrophilen induziert.[81] Zudem kann speziell eine starke Galaktosylierung der Fc-Domäne von IgG_1-Autoantikörpern zur Verminderung der EBA beitragen, während ein allgemein hoher Glykosylierungsstatus des Fc-Fragments von Autoantiköpern eine starke Bindung an aktivierende Fcγ-Rezeptoren vermittelt und dadurch die EBA-Entwicklung fördert.[82,83]

Nach ihrer Aktivierung durch Antikörper und Komplementsystem setzen die neutrophilen Granulozyten reaktive Sauerstoff-Radikale und Proteasen wie Elastase und Gelatinase B (Matrix-Metalloproteinase 9) frei. Durch die Proteolyse extrazellulärer Proteine tragen die Neutrophilen zur Zerstörung des umliegenden Gewebes bei, reduzieren die Anzahl der Ankerfibrillen und ermöglichen damit die Separation von Epidermis und Dermis, also die Blasenbildung in der Haut.[84,85] Neutrophile Granulozyten stellen den Hauptanteil infiltrierender Leukozyten in Hautläsionen von EBA-Patienten dar und gelten als Haupt-Effektorzellen in der entzündlichen EBA.[62,78]

1.3 Mastzellen

1.3.1 Charakterisierung von Mastzellen

Mastzellen wurden zum ersten Mal ausführlich von Paul Ehrlich im Jahre 1877 beschrieben.[86] Sie sind Teil des angeborenen Immunsystems und entwickeln sich aus CD34-positiven, hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark.[87,88] Als unreife Mastzellen zirkulieren sie im Blut und wandern in ihr Zielgewebe ein, wo sie ihre gewebespezifische Differenzierung und Reifung vervollständigen.[89] Dieser graduelle Prozess wird von den Zytokinen Interleukin (IL)-4, IL-9 und Nerve growth factor (NGF) und vor allem durch den Stammzellfaktor (stem cell factor; SCF) beeinflusst[90], die im Mix zeitweise oder ständig auf die Mastzellen wirken.[91]

Mastzellen sind langlebige und mit einem Durchmesser von etwa 20 µm große Zellen, die in der Lage sind, auch nach vollständiger Differenzierung den Zellzyklus für ihre lokale Proliferation wieder aufzunehmen. Auf diese Weise regulieren sie ihre Zahl im Gewebe zusätzlich zu Migration, Überleben und Rekrutierung weiterer Mastzellen aus der Peripherie.[89] Trotzdem sind Mastzellen weitgehend immobile Zellen. Weitverbreitet befinden sie sich in vielen Geweben mit einer Prävalenz für Grenzflächen-Regionen mit Barrierefunktion wie Haut, Mukosa des Genital-, Respirations- und Gastrointestinaltrakts und vielen anderen vaskularisierten Geweben inklusive der lymphatischen Organe. Im Gewebe selbst befinden sich Mastzellen häufig in der Nähe von Blut- und lymphatischen Gefäßen, peripheren Nerven, glatten Muskelzellen und schleimproduzierenden Zellen (beides nur im Gastrointestinal- und Respirationstrakt) und Haarfollikeln.[92,93] Dabei kommen etwa zehnmal mehr Mastzellen in der oberen Dermis als in der Hypodermis vor und ihre Verteilung im Körper korreliert mit der Dichte an Nervenenden. Demzufolge befindet sich die geringste Mastzelldichte im Rumpfbereich (30-40 Mastzellen/mm^2), während die Extremitäten wie Finger, Kinn und Nase anderthalb bis zweimal mehr Mastzellen besitzen. Neben dieser intra-individuellen Ungleichverteilung der Mastzellen gibt es keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern oder verschiedenen Altersgruppen. In Mäusen ist auch der Peritonealraum mit Mastzellen besiedelt.[94]

Somit sind Mastzellen optimal im Organismus positioniert, um als eine der ersten Immunzellen mit Antigenen, Allergenen und Toxinen aus der Umwelt sowie invasiven Pathogenen zu interagieren, weshalb sie auch als "first line-Defender" bezeichnet werden.[95]

Einhergehend mit ihrem anatomischen Vorkommen besitzen Mastzellen ein gewebespezifisches Muster an Mediatoren, weshalb sie in zwei wesentliche Unterformen unterteilt werden können.
Im Maussystem wird eine Unterteilung der Mastzellen entsprechend ihres Vorkommens im Organismus vorgenommen. Die mukosalen Mastzellen befinden sich in Lunge, Gastrointestinal- und Genitaltrakt und produzieren ausschließlich die Mastzellproteasen (MCP) β-Chymasen MCP-1 und MCP-2. Hingegen sind die Bindegewebs-Mastzellen in der Dermis der Haut lokalisiert und synthetisieren die α-Chymase MCP-5 und β-Chymase MCP-4, die Tryptasen MCP-6 und MCP-7 und Carboxypeptidase A3.[96–98]
Im Menschen werden Mastzellen anhand ihres Gehalts an neutralen Proteasen unterschieden. Humane Mastzellen in der Mukosa von Lunge und Darm besitzen α- und β-Tryptase in ihren Granula und gehören zum MC_T-Typ. Mastzellen in Hypodermis und Dermis der Haut hingegen speichern Tryptase, Chymase und Carboxypeptidase A, wodurch sie zum MC_{TC}-Typ zählen.[99] Bezüglich der Lokalisation entsprechen Mastzellen des MC_T-Typs am ehesten den mukosalen Mastzellen, während der MC_{TC}-Typ den Bindegewebs-Mastzellen ähnelt.[92]
Es sollte immer berücksichtig werden, dass sich humane und murine Mastzellen wesentlich in ihrer Zytokinproduktion, Synthese von Proteasen und Expression von Rezeptoren unterscheiden.[100,101]

Neben den beschriebenen Mastzell-Unterformen unterscheidet man individuelle Mastzell-Populationen mit verschiedenen biochemischen und funktionalen Eigenschaften. Wachstumsfaktoren, Zytokine und andere Signale aus der direkten Umgebung oder im Verlauf einer Immunantwort generieren diese Populationen, indem sie die lokale Zellzahl, Gewebeverteilung, Funktion und Granula-Zusammensetzung der Mastzellen modulieren.[100] Die daraus entstehende Mastzell-Heterogenität ermöglicht die Flexibilität und Diversität der Mastzellen bezüglich ihrer Aktivierung und ihrer Rolle in verschiedenen Prozessen im Körper.[102,103]

1.3.2 Rezeptoren und Stimuli der Mastzellen

Mastzellen exprimieren ein großes Spektrum an Rezeptoren, allen voran den hoch-affinen IgE-Rezeptor FcεRI. Dieser besitzt eine außergewöhnlich hohe Affinität für IgE (10^{-10} M) und eine sehr langsame Dissoziationsrate, weshalb Mastzellen ständig mit Antigen-spezifischem IgE beladen sind. Außerdem besitzen sie den niedrig-affinen IgG-Rezeptor FcγRIIA, diverse Zytokinrezeptoren, Rezeptoren für Komplementfaktoren wie C3a und C5a, Toll-like-

Rezeptoren (TLR) 1-4, 6, 7, 9 und Toxinrezeptoren. Der humane hoch-affine FcγRI wird nur in wenigen Fällen auf humanen Mastzellen exprimiert, kann aber durch Interferon-γ (IFNγ) auf kultivierten Mastzellen induziert werden.[104] Weiterhin besitzen Mastzellen Rezeptoren für Zell-Zell-Interaktionen beispielsweise den OX40-Liganden, um mit regulatorischen T-Zellen zu interagieren.[103,105]
Überlebenswichtig für Mastzellen ist außerdem die Expression des funktionalen SCF-Rezeptors, c-Kit. Dieser wird, wie auch der FcεRI, in hoher Anzahl auf ihrer Zelloberfläche exprimiert. Das Signal des SCF-Rezeptors ist essenziell für die Entwicklung und Reifung, für Proliferation und Überleben der Mastzellen. Über c-Kit werden sie außerdem zur Differenzierung, Einwanderung in Zielgewebe und Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine stimuliert.[89,100,106,107]

Aufgrund des Spektrums an Rezeptoren können Mastzellen durch eine Vielzahl an Stimuli aktiviert werden. Der am besten untersuchte Mechanismus zur Mastzellaktivierung läuft über die Kreuzvernetzung der FcεRI-gebundenen IgE-Moleküle durch multivalente Antigene (Abschnitt 1.3.3). Darüber hinaus können Mastzellen aber auch durch andere Stimuli des Immunsystems aktiviert werden. Über ihren IgG-Rezeptor, FcγRIIA (murin: FcγRIIIA, FcγRIIB) binden sie Immunkomplexe, die aus Antigenen und IgG-Molekülen aufgebaut sind und zur Kreuzvernetzung der IgG-Rezeptoren führen. Die Aggregation des FcγRIIA resultiert in der Freisetzung verschiedenster Mastzellmediatoren, während durch die Aktivierung über FcγRI nur eine begrenzte Anzahl an Mediatoren wie β-Hexosaminidase, LTC_4 und TNFα sezerniert wird.[101] Die während einer Immunantwort aktivierten Komponenten der Komplementkaskade wie die Spaltprodukte und Anaphylatoxine C3a und C5a sind ebenfalls potente Mastzell-Aktivatoren.[108] Weitere Stimuli für Mastzellen umfassen Neuropeptide, Produkte von Pathogenen, Zytokine, Hormone und physikalische Aktivatoren wie Druck und mechanische Verletzungen. Die Sensitivität der Mastzellen gegenüber diesen FcεRI-unabhängigen Stimuli variiert in den verschiedenen Mastzell-Populationen.[93,109,110]

1.3.3 Wirkungsweise der Mastzellen und ihre Beteiligung an immunologischen Prozessen

Ihre vielfältigen Funktionen vermitteln Mastzellen über ihre Bandbreite an Mediatoren (humorale Immunmechanismen). Diese speichern sie entweder vorgeformt in ihren zahlreichen zytoplasmatischen Granula oder synthetisieren sie nach ihrer Aktivierung neu. Dadurch lassen sich drei Phasen von Mastzellmediatoren unterscheiden, die zeitlich versetzt freigesetzt werden.

Innerhalb weniger Minuten nach der Aktivierung erfolgt die Degranulation der Mastzellen. Dabei werden durch Verschmelzung der Vesikelmembran mit der Zellmembran die in den Granula gespeicherten Stoffe in den Extrazellularraum ausgeschüttet. Bei diesem Kalzium-abhängigen Prozess erfolgt die Freisetzung vasoaktiver Amine (v.a. Histamin), neutraler Proteasen (Tryptase, Chymase, Carboxypeptidase A), Proteoglykane, Polypeptide, einiger Zytokine (IL-4, TNFα)[111–113] und Wachstumsfaktoren (z.B. GM-CSF). Sie bewirken eine Vasodilatation, erhöhte Gefäßpermeabilität, Konstriktion glatter Muskeln und Schleimsekretion. Weitere Funktionen der Mastzellproteasen beinhalten die Degradation von Matrix-Metalloproteasen (MMPs), exo- und endogenen Toxinen und Giften sowie den Abbau von Kollagenen und Fibronektin.[93,102]

Anschließend erfolgt über die Aktivierung der Phospholipase A_2 die Synthese von Lipidmediatoren wie Leukotrienen (LTB_4) und Prostaglandinen (PGD_2,), die innerhalb von dreißig Minuten bis vier Stunden nach Zellaktivierung freigesetzt werden. Zusammen mit den Mediatoren der ersten Phase verursachen sie Bronchokonstriktion und Vasodilatation. Darüber hinaus induzieren sie proinflammatorische Immunantworten, regulieren Th2-Zellen und rekrutieren Effektorzellen (Granulozyten, Monozyten, T- und B-Zellen, dendritische Zellen (DCs)).[102,114]

Die dritte Phase der Mediatorfreisetzung beinhaltet neu synthetisierte Zytokine (z.B. IL-1 bis -6, -8, -10, -13, -14, -16, TNFα), Chemokine (u.a. CCL2, CCL3) und verschiedene Wachstumsfaktoren (z.B. GM-CSF, VEGF), die etwa 6 bis 24 Stunden nach dem Antigen-Kontakt sezerniert werden. Diese sorgen für die Verstärkung und Aufrechterhaltung des proinflammatorischen Milieus[115] und für die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Immunzellen wie basophiler und neutrophiler Granulozyten.[100]

Mithilfe dieser drei Mediatorgruppen können Mastzellen sowohl die frühe Phase einer Immunantwort einleiten als auch zur Chronifizierung der Entzündung beitragen.

Mastzellen besitzen Effektorfunktionen innerhalb sowie auch außerhalb des Immunsystems, die sie über ihre Mediatoren vermitteln. Dabei bestimmt das Zusammenspiel der Signale die finale Antwort der einzelnen Mastzelle. Als Immunzellen liegt die Hauptaufgabe von Mastzellen in der angeborenen Immunität, indem sie die Biologie von Immunzellen wie neutrophilen Granulozyten, Monozyten, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen beeinflussen. Darüberhinaus können sie die adaptive Immunantwort initiieren, amplifizieren und regulieren. Beispielsweise sind Mastzellen in der Lage, die Antigenpräsentation der DCs zu übernehmen, in die Lymphknoten zu migrieren und auf diese Weise die T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion zu aktivieren. Hauptsächlich induzieren Mastzellen jedoch durch Sekretion von TNFα und PGD_2 die Migration der DCs in die Lymphknoten und beeinflussen deren Funktion und Reifung.[93,102,103] Zudem dienen Mastzellen der Abwehr von

Pathogenen. Diese detektieren sie direkt über ihre TLRs oder indirekt über das aktivierte Komplementsystem und limitieren deren Zahl entweder selbst oder initiieren und regulieren die Infiltration und Aktivierung von DCs, T- und B-Zellen sowie Makrophagen und Neutrophilen.[91,93,103,116] Dies erklärt den Umstand, dass Mastzellen verstärkt an Eintrittspforten potenzieller Infektionserreger auftreten.
Neben ihrer Funktion in der direkten Abwehr können Mastzellen auch als regulatorische Zellen agieren. So verringern sie über die Freisetzung von TGFβ, IL-4, IL-10 und Histamin die Zahl der Granulozyten, T-Zellen und Makrophagen am Entzündungsort und supprimieren die Immunantwort.[103,113] Auf diese Weise können Mastzellen im Verlauf einer Immunantwort sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen ausüben.[113]

Mastzellen sind an komplexen autokrinen und parakrinen Netzwerken beteiligt, wodurch sie Gewebeveränderungen, komplexe biologische Funktionen sowie ihre eigene Funktion und Zellzahl beeinflussen. Auf diese Weise regulieren Mastzellen auch die Biologie von Strukturzellen wie Fibroblasten und Gefäßendothelzellen.[91,95]

1.3.4 Mastzell-defiziente Mausstämme

Für die Erforschung von Mastzellfunktionen und ihrer Beteiligung in immunologischen Prozessen haben sich Mastzell-defiziente Mausstämme als hilfreiches Werkzeug erwiesen. Die bisher beschriebenen Mastzell-defizienten Linien zeichnen sich entweder durch einen konstitutiven oder einen konditionalen Verlust von Mastzellen aus. Basierend auf Mutationen im *c-kit*-Gen wurden verschiedene Mastzell-defiziente Mausstämme gezüchtet, wozu der C57BL/6-*Kit*$^{W\text{-}sh/W\text{-}sh}$-Stamm (W-sh) und der WBB6F$_1$-*Kit*$^{W/W\text{-}v}$-Stamm (W/W-v) zählen. Mithilfe beider Stämme wurden zahlreiche Befunde auf dem Gebiet der Mastzellforschung etabliert, weshalb sie zu den am besten untersuchten Mäusen mit konstitutivem Verlust von Mastzellen gehören.[87,117] Zusätzlich zu diesen konstitutiven Mastzell-defizienten Mäusen wurde vor einigen Jahren ein konditional Mastzell-defizienter Stamm entwickelt, der sogenannte doppelt transgene *Mcpt5-Cre iDTR*-Mausstamm (Cre/iDTR).[118,119] Für die Generierung dieses Stammes wird der *Mcpt5-Cre*-Stamm, der die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des nur in Bindegewebs-Mastzellen aktiven *Mastzellprotease(Mcpt)5*-Promotors exprimiert, mit dem DTR-Stamm gekreuzt, in dem die Expression des humanen Diphtherietoxin-Rezeptors (DTR) unter Kontrolle des ubiquitär aktiven *ROSA26*-Promotors durch ein von loxP-Stellen flankiertes Stopp-Element verhindert wird. Durch das gezielte Herausschneiden des loxP-flankierten Stopp-Elements durch die Cre-Rekombinase wird der humane Diphtherietoxin-Rezeptor ausschließlich auf den Bindegewebs-Mastzellen

exprimiert, weshalb die Mastzellen durch die Applikation des Diphtherietoxins spezifisch in der Haut depletiert werden können.[120]

1.3.5 Mastzellen in chronischen Erkrankungen

Mastzellen sind in viele pathophysiologische Prozesse involviert. So können sie das Tumorwachstum beeinflussen[96,121] und sind wesentlich an der Entstehung und Aufrechterhaltung von chronischen Erkrankungen beteiligt.[102] Letztere Eigenschaft wird vor allem durch Mastzellproteasen hervorgerufen, die zu dem Entzündungs-assoziierten Gewebeumbau in Lunge, Haut und Herz beitragen.

In der Vergangenheit wurden Mastzellen ausführlich als zentrale Mittler in allergischen und anaphylaktischen Reaktionen untersucht und beschrieben.[122] Ihre essenzielle Funktion vermitteln Mastzellen dabei nach der Kreuzvernetzung der IgE-Moleküle und der damit einhergehenden FcεRI-Aggregation durch die Freisetzung von u.a. Histamin, LTB_4 und PGD_2. Diese Mastzellmediatoren rufen akute Symptome der Sofortreaktion hervor wie Bronchokonstriktion, Vasodilatation und vermehrte Schleimproduktion, und rekrutieren Leukozyten, die die Späte-Phase-Reaktion einleiten und damit zur Chronifizierung der Allergie beitragen können.[96,102]

Während die Beteiligung von Mastzellen in allergischen Prozessen bestens bekannt ist, wurde ihre Rolle in der Autoimmunität erst in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher Studien. So konnten Mastzellen kürzlich als krankheitsfördernde Effektorzellen in Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis[123], der multiplen Sklerose[124] und des bullösen Pemphigoids[125] entdeckt werden.[101,115,126] Ihre Aktivierung in diesen Erkrankungen erfolgt zumindest teilweise über IgE-unabhängige Mechanismen wie der Stimulation durch IgG-Immunkomplexe, Komplementfaktoren, Zytokine und Neuropeptide (**Abb. 1.3**).[103] Die daraufhin freigesetzten Mastzellmediatoren induzieren eine erhöhte Gefäßpermeabilität, wodurch weitere Immunkomplexe ins Gewebe eintreten und tragen zur Gewebezerstörung und damit zur Freisetzung weiterer Autoantigene bei. Zudem ermöglichen sie eine verstärkte Infiltration von Immunzellen, vor allem von neutrophilen Granulozyten, an den Entzündungsort u.a. durch die Hochregulation der Adhäsionsmoleküle auf dem Endothel.[96] Auf diese Weise amplifizieren Mastzellen die entzündliche Immunantwort und verstärken außerdem den Autoimmunprozess.[127,128]

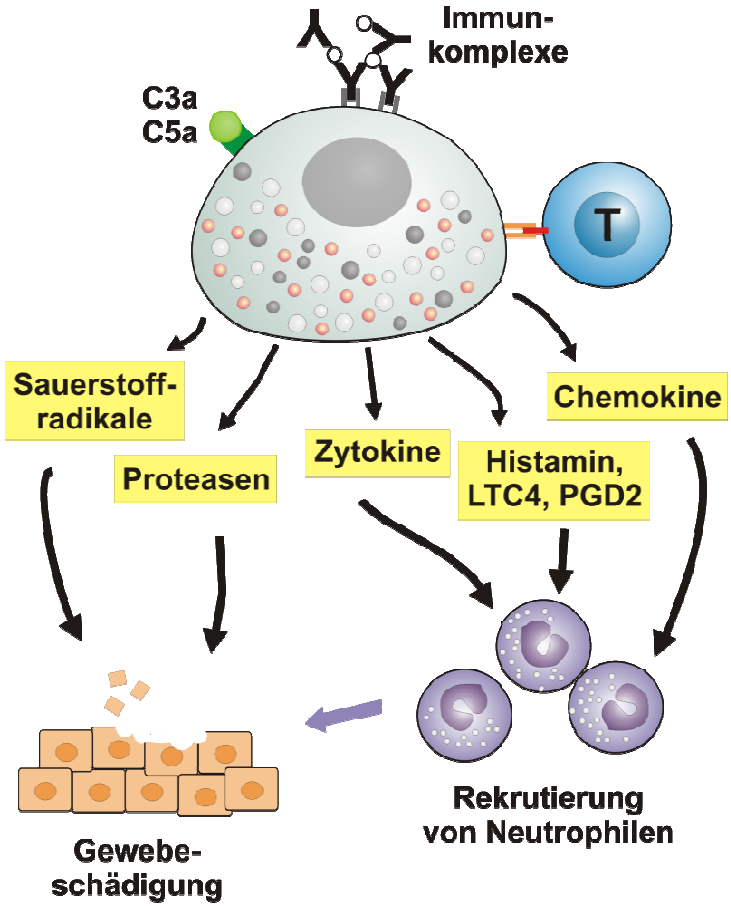


Abb. 1.3: Beitrag der Mastzellen zur Gewebeschädigung in Entzündungsprozessen
Zu Beginn und im Verlauf von (Auto)Immunantworten können Mastzellen durch IgG-Immunkomplexe, die Anaphylatoxine C3a und C5a sowie durch Zell-Zell-Kontakt beispielsweise mit T-Zellen aktiviert werden. Daraufhin freigesetzte Mediatoren umfassen zahlreiche Zytokine, Chemokine und Lipidmediatoren, die vor allem die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Immunzellen induzieren, die zur Schädigung des Gewebes beitragen. Darüber hinaus werden in den Mastzell-Granula gespeicherte Proteasen sowie Sauerstoffradikale freigesetzt, welche ebenfalls an einer Gewebsschädigung beteiligt sein können.

1.4 Ziel der Arbeit

Mastzellen sind multifunktionale Zellen, deren pathophysiologische Rolle im Immunsystem nicht auf die Vermittlung allergischer Reaktionen beschränkt ist, sondern sich auch auf zahlreiche andere chronische Erkrankungen erstreckt. Aufgrund dieser Eigenschaften sind sie zu einem attraktiven Ziel für neue Therapieansätze geworden.

Die Rolle von Mastzellen in blasenbildenden Autoimmundermatosen wurde bisher nur wenig untersucht. In initialen Studien der Arbeitsgruppe um Liu und Mitarbeiter im experimentellen bullösen Pemphigoid (BP) konnte diesen Zellen eine essenzielle Funktion in der Initiierung der Entzündungskaskade zugewiesen werden.[125,129–131] Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Mastzellen auch in anderen Autoimmunerkrankungen der Haut eine zentrale Rolle spielen könnten. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die potenzielle Funktion der Mastzellen in der Pathophysiologie der dem BP nahe verwandten Autoimmunerkrankung Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) untersucht werden. Die Arbeit stellt damit die Grundlage dafür, inwieweit Mastzellen als ein neues Ziel für therapeutische Ansätze zur Behandlung von Patienten mit einer EBA eingesetzt werden können.

Durch eine Reihe von Untersuchungen mit humanen Hautmastzellen *in vitro* und verschiedenen Mastzell-defizienten Mausstämmen *in vivo* in Modellen der EBA sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Sind Mastzellen generell an der Pathogenese der EBA beteiligt?

2. Welche Stimulatoren aktivieren Mastzellen?

3. Über welche Mechanismen und Mediatoren tragen Mastzellen zur Ausprägung der EBA bei?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Spezifität	Isotyp	Klon	Konjugat	Hersteller	Anwendung
Maus α-hCD16	IgG1	3G8	-	Biolegend	DZ
Maus α-hCD32	IgG1	AT10	-	GeneTex Inc	DZ
Maus α-hCD64	IgG1	10.1	-	GeneTex Inc	DZ
Maus α-hCD117	IgG1	AC126	Microbeads	Miltenyi Biotec	MZI
humanes IgE	IgE	polyklonal	-	LG Biochemische Immunologie	DZ, ZK
Ziege α-hIgE	IgG	polyklonal	-	BioSource	ZK
Ratte α-mC3	IgG2a	RMC11H9	-	Biozol, D- Eching	IHC
Kaninchen α-mCOL7	IgG	polyklonal	-	Dermatologie, Lübeck	in vivo
Kaninchen α-mCOL7 (part C)	IgG	polyklonal	-	Dermatologie, Lübeck	ZK
Ratte α-mLy-6G/Ly-6C	IgG2b	NIMP-R14	-	Santa Cruz	DZ
Ziege α-mIgG	IgG	polyklonal	DTAF	Dianova	DZ
Esel α-kIgG	IgG	polyklonal	DyLight649	Dianova	IHC
Ziege α-rIgG	IgG	polyklonal	AlexaFluor488	Invitrogen	DZ, IHC
Maus α-zIgG	IgG	polyklonal	DTAF	Dianova	DZ
Isotyp kIgG	IgG	polyklonal	-	Dermatologie, Lübeck	in vivo
Isotyp mIgG1, κ	IgG1	MOPC-21	-	Biolegend	DZ, ZK
Isotyp rIgG2a, κ	IgG2a	RTK2758	-	Biolegend	DZ, IHC
Isotyp zIgG	Serum	polyklonal	-	ICN Pharmaceuticals Inc.	DZ

h = human; k = Kaninchen; m = Maus; r = Ratte; z = Ziege; COL7 = Kollagen Typ VII

DZ = Durchflusszytometrie; IHC = Immunhistochemie; MZI = Mastzell-Isolation; ZK = Zellkultur

2.1.2 Enzyme, Inhibitoren, Stimuli

Substanz	Hersteller
humanes C5a, rekombinant	Biozol, D-Eching
C5a Rezeptor-Antagonist (W-54011)	Santa Cruz, CA, USA
Diphtherietoxin (Corynebacterium diphtheriae)	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
fMLP (N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine)	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
Hyaluronidase	Worthington Biochemical Cooperation, Lakewood, NJ, USA
Kollagenase Typ 2	Worthington Biochemical Cooperation, Lakewood, NJ, USA
murines Kollagen Typ VII (mCOL7)	Dermatologie, Lübeck
Pyrilaminmaleat	Sigma-Aldrich, D-Steinheim

2.1.3 Primersequenzen

Primer	Sequenz
Mcpt5-Cre-UP	5'-ACA GTG GTA TTC CCG GGG AGT GT-3'
CreSeq1b-DO	5'-GTG AGT GCG TTC AAA GGC CA-3'
Mcpt5-Ex1-DO3	5'-GCT TTG GTG CGT GAA CCC AGG A-3'
iDTR-UP1	5'-GGA AAG TCC GTG ACT TGC AAG AG-3'
iDTR-DO	5'-TCA GTG GGA ATT AGT CAT GCC-3'

Alle Primer wurden von metabion international AG (D-Martinsried) hergestellt und geliefert.

2.1.4 Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
4-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
Agarose	peqLab, D-Erlangen
Aqua dest *(Aqua ad iniectabilia)*	B. Braun, D-Melsungen
BSA, low endotoxin	PAA, A-Pausching
DABCO	Roth, D-Karlsruhe
Desoxynukleotide (dNTPs)	Roth, D-Karlsruhe
EDTA	Merck, D-Darmstadt
Ethanol, absolut	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
Evans Blue	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
FCS	PAN, D-Aidenbach
Formaldehyd, 35 %	Merck, D-Darmstadt
Formamid	Merck Millipore
Glycerin	Biomol, D-Hamburg
HEPES	Merck, D-Darmstadt
Kaisers Glyceringelatine	Merck, D-Darmstadt
Ketamin, 10%	WDT, D-Garbsen
Natriumhydroxid; Plätzchen (NaOH)	Merck, D-Darmstadt
Pancoll human (Dichte 1,077 g/mL)	PAN Biotech GmbH, D-Aidenbach
Paraplast Plus (Paraffin)	Roth, D-Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
Penicillin	PAA, A-Pausching
Percoll	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
Phosphatpuffer (Na_2HPO_4)	Merck, D-Darmstadt
Plasmasteril	Fresenius KABI, D-Bad Homburg
Roti-ImmunoBlock	Roth, D-Karlsruhe
Roti®-Safe GelStain	Roth, D-Karlsruhe

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
RPMI 1640, modifiziert	Biochrom AG, D-Berlin
StemPro-34 (Gibco)	Invitrogen, D-Darmstadt
Streptavidin	PAA, A-Pausching
TAE-Puffer, 50x	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
Triton X-100	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
Xylazin (Rompun®), 2%	Bayer, D-Leverkusen

2.1.5 Fertig-Reagenzsätze

Bezeichnung	Hersteller
Bio-Plex Pro™ Mouse cytokine assay (23-plex)	Bio-Rad Laboratories Inc., D-München
DNeasy 96 Blood and Tissue Kit	Qiagen, D-Hilden
DreamTaq DNA Polymerase, Fermentas	Thermo Scientific, D-St. Leon-Rot
GeneChip Human Gene 1.0 ST Array	Affymetrix, Santa Clara, CA. USA
GeneChip WT Terminal Labeling Kit	Affymetrix, Santa Clara, CA. USA
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, D-Mannheim
Mouse IgG total Ready-SET-Go!	eBioscience, A-Wien
Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit	Sigma-Aldrich, D-Steinheim
WT Expression Kit (Ambion)	Invitrogen, D-Darmstadt

2.1.6 Geräte

Laborgeräte	Hersteller
Autotechnikon *Microm STP 120*	Thermo Scientific, D-Langenselbold
Boyden-Kammer *AP48* (48-well)	Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD USA

Laborgeräte	**Hersteller**
Cryo-Mikrotom *CM 3000* (mit Schneideblock *Jung 2045 C*)	Leica, D-Nussloch
ELISA Reader *Tecan Sunrise*	Tecan, D-Crailsheim
Fluoreszenzmikroskop *Olympus IX81*	Olympus, D-Hamburg
Gießstation, manuell; *EG1140 H*	Leica, D-Nussloch
Heizplatte *MR3001K*	Heidolph, D-Schwabach
Inkubator, 37°C, ohne CO_2; *Heraeus BB6060*	Thermo Scientific, D-Langenselbold
Inkubator, 37°C, mit CO_2; *Hera Cell*	Thermo Scientific, D-Langenselbold
Inkubator, 60 °C	Memmert, D-Schwabach
Kühlplatte, *EG 1140 C*	Leica, D-Nussloch
Lichtmikroskop	Zeiss, D-Göttingen
Lichtmikroskop *Olympus BX41* (Kamera: *Nikon DS-Ri1*)	Olympus, D-Hamburg
NanoDrop *1000*	Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA
Osmometer *Typ 6*	Löser Messtechnik, D-Berlin
Paraffin-Mikrotom *SM 2000R*	Leica, D-Nussloch
Schüttler *Typ 3015*	GFL, D-Burgwedel
Schüttler *Typ KL2*	Edmund Bühler GmbH, D-Hechingen
Thermal Cycler *MJ Mini*	Bio-Rad, D-München
Vakuumpumpe *ME2*	vacuubrand GmbH, D- Wertheim
Wasserbad *Typ 12B*	Julabo, D-Seelbach
Zentrifuge (0,2-2,0 mL Röhrchen; RNA-Isolation) *Mikro 200*	Hettich, D-Tuttlingen
Zentrifuge (0,2-2,0 mL Röhrchen; Serum-Gewinnung) *Mikro 22R*	Hettich, D-Tuttlingen
Zentrifuge (15-50 mL Röhrchen; Mastzell-Stimulation) *Rotina 46R*	Hettich, D-Tuttlingen
Zentrifuge (15-50 mL Röhrchen; Mastzellisolation) *Rotixa 50RS*	Hettich, D-Tuttlingen

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
5 mL- Polystyren FACS-Röhrchen mit Deckel	BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA
15 mL- und 50 mL-Röhrchen	Sarstedt, D-Nümbrecht
Einbettkassette (Histosette)	Sanowa, D-Leiman (G. Kisker)
Einbettmedium, Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek, D-Staufen
Einbettschälchen, Tissue-Tek® Intermediate Cryomold	Sakura Finetek, D-Staufen
FEATHER® Mikrotom-Einmalklingen A35 und C35	pfm medical, D- Köln
Gelröhrchen - BD Microtainer SST™ Tubes	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Platten PS-Mikroplatte, 96 well, F-Form Nunclon Surface PS-Mikroplatte, 96 well, U-Form NUNC F96 Maxisorp™Surface	 Greiner bio-one, D-Frickenhausen Greiner bio-one, D-Frickenhausen Thermo Scientific, D-Langenselbold
Polycarbonatmembran, 3 µm-Poren, 25x80mm, PVP-surface treatment	Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD USA
Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL)	Sarstedt, D-Nümbrecht
Zellkulturplatten Costar 24well bzw. 96well cell culture cluster, Flachboden	 Corning Incorporated, Corning, NY, USA

2.1.8 Mausstämme

Die C57BL/6J *Kit*$^{W\text{-}sh/W\text{-}sh}$- bzw. *Mcpt5-Cre iDTR*-Mäuse sind als Zuchtpaare von Charles River (Charles River, Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld) erworben bzw. im Rahmen einer Kooperation mit J. Scholten (Labor von A. Roers, Abteilung für Dermatologie, Universität Köln) zur Verfügung gestellt worden und wurden für die Dauer des Experiments in der Tierhaltung des Forschungszentrums Borstel gezüchtet. Mäuse des Stammes WBB6F$_1$/J *Kit*$^{W/W\text{-}v}$ stammten zusammen mit den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen WBB6F$_1$/J Kit$^{+/+}$ von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA).

Tiere der konstitutiv Mastzell-defizienten Mausstämme wurden im Alter von 10 bis 12 Wochen (weiblich und männlich) in den Versuch genommen. Im Fall der konditional Mastzell-defizienten *Mcpt5-Cre iDTR*-Mäuse wurden die Tiere (weiblich und männlich) bereits mit sechs bis neun Wochen für den Versuch verwendet, da sie zunächst für vier Wochen mit Diphtherietoxin vorbehandelt werden mussten und dann im Alter von zehn bis dreizehn Wochen für die Induktion der EBA eingesetzt werden konnten.

2.2 Isolierung und Kultur von Zellen

2.2.1. Isolierung von Bindegewebs-Mastzellen aus humaner Haut (Hautmastzellen)

Für die Isolierung von Bindegewebs-Mastzellen wurde gesunde humane Haut verwendet, die bei Operationen in der Klinik für Hand-, Brust- und Plastische Chirurgie am Klinikum Neustadt (Neustadt i. H., Deutschland) entnommen wurde. Für diese Studie liegt ein positives Gutachten der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck vor (AZ 09-137). Die Präparation der Mastzellen erfolgte, mit geringen Modifikationen, wie von Schiemann *et al.*[132] beschrieben.

Zunächst wurde das Fettgewebe und noch verbliebenes Operationsmaterial von der Haut entfernt und die so aufbereitete Haut in ca. 1 mm^2 große Stücke geschnitten, in Mastzellpuffer auf Eis gesammelt und über Nacht bei 4°C gelagert. Am Folgetag wurden die Hautstücke in frischem Mastzellpuffer aufgenommen und auf zwei Gefäße verteilt. Die für den Verdau benötigten Enzyme (final: 500 U/mL Kollagenase II; 330 U/mL Hyaluronidase; 1 mg/mL BSA low endotoxin) wurden zunächst in Mastzellpuffer gelöst und steril zu der Hautsuspension gegeben um den Verdau der Haut zu starten.

Die Ansätze wurden unter Rühren für vier Stunden bei 37°C inkubiert, wobei anfangs alle zehn Minuten, nach zwei Stunden alle 20 Minuten, das Rühren unterbrochen und die angedaute Haut mehrmals mit einer 50 mL-Spritze (mit vergrößertem Austrittsloch) auf- und abgepumpt wurde, um eine optimale Durchmischung des Gewebes mit den Enzymen zu gewährleisten.

Nach vier Stunden wurde der Verdau-Prozess durch Zugabe von 1% FCS abgestoppt. Die verdaute Haut wurde über ein feines Haushaltssieb gegeben und der Durchfluss in einem Becherglas aufgefangen. Der im Sieb zurückgebliebene Rückstand wurde verworfen und nur die im Becherglas gesammelte Zellsuspension weiterverwendet. Diese wurde anschließend durch eine 120 µm-feine Gaze filtriert um feinere Schleimrückstände und Gewebereste zu entfernen. Nach der Filtration wurde die Zellsuspension in 50 mL-Röhrchen überführt und zentrifugiert (300xg, Anlauf 7, Bremse 3, 10 min, 20 °C). Nach Absaugen des Überstandes wurden alle Sedimente vereint und für die Zellzählung in 1%FCS/Mastzellpuffer aufgenommen. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl sowie der Lebendzellzahl erfolgte mithilfe der Trypanblaufärbung, die der Mastzellzahl durch Anfärben mit Toluidinblau.

Für die nachfolgende Dichtegradientenzentrifugation wurden bereits am vorhergehenden Tag Percoll-Lösungen angesetzt und bei 20°C für die optimale Dichte gelagert. Für die 100%ige Percoll-Lösung wurde der 10x Mastzellpuffer 1:10 mit Percoll verdünnt; anschließend wurden daraus die 80%ige und 60%ige Percoll-Lösung mit 1x Mastzellpuffer hergestellt. Die Zellsuspension wurde 1:2 mit der 100%igen Percoll-Lösung verdünnt und der

Gradient, wie in **Abb. 2.1** gezeigt, geschichtet. Nach der Dichtegradientenzentrifugation befanden sich der Großteil an Mastzellen in der 50-60%- sowie in der 60-80%-Fraktion, wohingegen in der 0-50%-Fraktion hauptsächlich Zellfragmente und im Sediment Erythrozyten und tote Zellen vorlagen. Die Fraktionen 50-60% und 60-80% wurden vereint, zuerst mit 1%FCS/Mastzellpuffer, dann mit entgastem PBS gewaschen (Zentrifugation: 300xg, Anlauf 5, Bremse 3, 10 min, 8°C) und für die Zellzählung mit Trypanblau und Toluidinblau gefärbt.

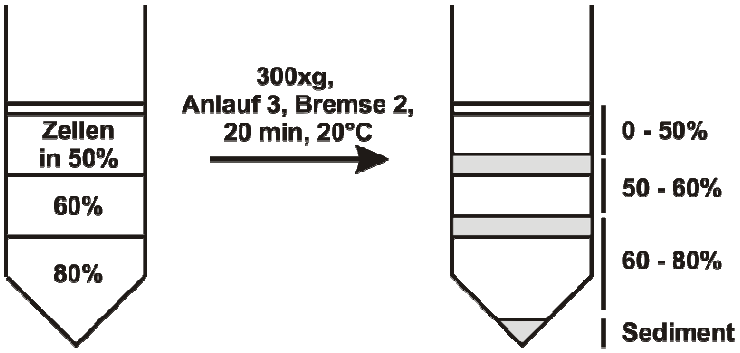


Abb. 2.1: Schichtung des Dichtegradienten vor (links) und nach (rechts) der Zentrifugation
Prozentangaben beziehen sich auf die jeweilige Dichte der Percoll-Lösung.

Um die Reinheit der Mastzellen in der Zellsuspension zu erhöhen, wurde anschließend eine Positivselektion der Mastzellen mithilfe von anti-CD117-Microbeads entsprechend den Herstellerangaben vorgenommen. Die Lebendzellzahl und der Mastzellanteil der im Säuleneluat enthaltenen Zellen wurde durch Zellzählung bestimmt, die Zellen mit Mastzellmedium gewaschen und zum Schluss zu $5x10^5$ Lebendzellen/mL in Mastzellmedium zunächst für mindestens neun Tage bei 37°C, 5,0% CO_2 kultiviert.

Lag die Viabilität der Mastzellsuspension nach einer Woche in Kultur unter 80%, wurden die toten Zellen mithilfe eines Pancoll-Gradienten entfernt. Dazu wurde Pancoll mit der Zellsuspension überschichtet, zentrifugiert (300xg, Anlauf 3, Bremse 1, 20 min, RT), der Zellring (Lebendzellen) großzügig abgeerntet und in Mastzellmedium gewaschen. Nach der Zellzählung (Trypanblau und Toluidinblau) wurden die Zellen wieder zu $5x10^5$ Lebendzellen/mL in Mastzell-Medium aufgenommen und kultiviert.

2.2.2 Stimulation humaner Hautmastzellen *in vitro*

Die für die Stimulation verwendeten humanen Bindegewebs-Mastzellen wurden aus humaner Haut isoliert (Abschnitt 2.2.1). Die Mastzellen wurden 18 Stunden vor Versuchsbeginn mit 0,5 µg/mL humanem IgE beladen und vor Stimulationsbeginn zweimal mit CL-Medium *komplett* gewaschen (Zentrifugation: 300xg, 10 min, 25°C).

Zur Aktivierung der Mastzellen mit immobilisierten Immunkomplexen (iIC) wurden Vertiefungen einer Zellkulturplatte (costar, Flachboden) für 16 h bei 4°C mit 5 µg/mL mCOL7 beschichtet und nach dreimaligem Waschen mit PBS mit Blockingpuffer blockiert (37°C, 2 h). Nach Zugabe von 2,5 µg/mL amCOL7-IgG (verdünnt in Blockingpuffer) für eine weitere Stunde bei 37°C wurden nicht gebundene Antikörper durch Waschen entfernt.

In einigen Ansätzen befand sich das Anaphylatoxin C5a (100 nM final) allein oder in Kombination mit den immobilisierten Immunkomplexen. In Kontrollen wurde anti-humanes IgE (6 µg/mL final) (Positivkontrolle) oder Medium allein (Negativkontrolle) gegeben. Vor Zugabe der Mastzellsuspension wurden alle Stimuli bei 37°C vorgewärmt. Mastzellen ($0{,}5x10^6$ Zellen/mL in CL-Medium *komplett*) wurden für 10 min bei 37°C vorgewärmt und anschließend bei 37°C, 5,0% CO_2 mit den Stimuli inkubiert.

Die Überstände wurden nach 30 min, 4 h und 24 h abgenommen und in einem separaten Reaktionsgefäß gesammelt. Nach 4 h wurden außerdem die Mastzellen von der Zellkulturplatte geerntet und für die RNA-Isolierung verwendet (Abschnitt 2.6.1). Alle gesammelten Überstände wurden zentrifugiert (300xg, 10 min, 8°C) und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um eventuell mitgeführte Mastzellen aus dem Überstand zu entfernen. Die Lagerung der Mastzell-Überstände erfolgte bei –20°C.

2.2.3 Isolierung von neutrophilen Granulozyten aus humanem Vollblut

Neutrophile Granulozyten wurden aus frisch abgenommenem Citrat-Blut freiwilliger, gesunder Spender mithilfe eines Verfahrens, kombiniert aus Sedimentation und Dichtegradientenzentrifugation, isoliert.[133] Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck positiv begutachtet (AZ 08-151).

Zur Abreicherung der Erythrozyten wurde das Vollblut zunächst zu gleichen Teilen mit Plasmasteril und PBS-D verdünnt und in einem Messzylinder für 30-45 min stehen gelassen. Nach Sedimentation der Erythrozyten wurden die Überstände auf 8 mL Pancoll geschichtet. Da Pancoll eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten besitzt, sedimentieren diese Zellen beim Zentrifugieren (850xg, Anlauf 3, Bremse 1, 24 min, RT), wohingegen Lymphozyten und Monozyten sich als Zellring oberhalb des Pancolls ablagern. Der Überstand wurde entfernt und die Sedimente wurden zur Lyse restlicher Erythrozyten in

5 mL eiskaltem Aqua dest resuspendiert. Nach 45 sec wurde durch Zugabe von 5 mL kaltem 2x PBS-D wieder eine isotonische Zellsuspension hergestellt und die Zellen mit eiskaltem PBS-D (300xg, Anlauf 7, Bremse 3, 10 min, 8 °C) gewaschen. Die Granulozyten wurden in einem definierten Volumen eiskaltem PBS-D aufgenommen, die Zellzahl mithilfe der Neubauer-Kammer bestimmt und die Zellen in der gewünschten Zelldichte eingestellt.

2.3 Nachweisverfahren der Zellaktivierung

2.3.1 Bestimmung der relativen Menge freigesetzter β-Hexosaminidase in Mastzellkultur-Überständen

Bei der Degranulation verschmelzen Granula- und Zellmembran miteinander und die in den Granula gespeicherten Inhaltsstoffe, zu denen. auch das Enzym β-Hexosaminidase zählt, werden in den Extrazellularraum freigesetzt. Dabei verhält sich die ausgeschüttete Menge und Aktivität des Enzyms direkt proportional zur Stärke der Degranulation. Die auf diesem Prinzip basierende Bestimmung der β-Hexosaminidase-Aktivität wurde mit geringen Modifikationen nach Schwartz *et al.*[134] durchgeführt. Dazu wurden 10 µL jeden Überstandes 1:10 mit PBS-D (mit Ca^{2+},Mg^{2+}) + 0,1% BSA in einer 96-Well-Platte verdünnt und anschließend in drei Schritten einer seriellen 1:2-Verdünnung mit dem selben Puffer ausgedünnt. Die Enzymreaktion erfolgte nach Zugabe von 50 µL der β-Hexosaminidase-Substratlösung zu jedem Ansatz für 18 h bei 37°C. Bei dieser Reaktion setzt das Enzym hydrolytisch 4-Nitrophenol aus dem in der Lösung enthaltenen 4-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminid frei, das bei Beendigung des Prozesses mit 50 µL basischer Stopplösung Phenolate bildet, die wiederum den Farbumschlag der Lösungen von farblos zu gelb verursachen. Die Extinktion der Ansätze wurde im Mikrotiterplattenphotometer bei λ = 405 nm (Referenzwellenlänge: λ = 620 nm) gemessen. Die Menge der freigesetzten β-Hexosaminidase wurde im Verhältnis zur Gesamtaktivität in mittels 0,05% Triton X-100 gewonnenen Zelllysaten bestimmt.

2.3.2 Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten auf Mastzellkultur-Überständen

Prinzip

Die Chemotaxis wurde nach der Methode von Ludwig *et al.*[135] in einer 48-Well-Chemotaxiskammer untersucht. Bei diesem Ansatz wird die gerichtete Migration von Zellen

entlang des Konzentrationsgradienten eines Chemokins gemessen und damit die chemotaktische Wirksamkeit eines Stoffes auf einen speziellen Zelltyp untersucht.
Die in dieser Arbeit verwendete 48-Well-Boyden-Kammer besteht aus einem unteren Kompartiment für die Stimuli und einem oberen Kompartiment mit bodenlosen Vertiefungen für die Zellsuspension, welche durch eine Polycarbonat-Membran mit einer definierten Größe (für Neutrophile 3 µm) getrennt sind. Während des Versuchs diffundiert der Stimulus aus dem unteren in das obere Kompartiment und bildet einen Konzentrationsgradienten aus, entlang dessen die Zellen in die untere Kammer wandern und dort quantifiziert werden können.
Die Anzahl gewanderter Zellen wurde nach Modifikation eines von Creamer *et al.*[136] beschriebenen Verfahrens anhand des Myeloperoxidase-Gehalts nach Lyse über eine entsprechende Standardreihe aus lysierten Zellen definierter Konzentration bestimmt. Die endogene Myeloperoxidase der neutrophilen Granulozyten setzt als Substrat die farblose Leukoform des Tetramethylbenzidins ($TMBH_2$) um und wandelt es unter Zugabe von Wasserstoffperoxid in den blaugrünen Farbstoff Tetramethylbenzidin (TMB) um. Durch Zugabe von Schwefelsäure wird diese Redox-Reaktion unterbrochen und es findet ein Farbumschlag der Lösungen von blau nach gelb statt. Die Extinktion der Ansätze kann dann bei einer Wellenlänge von λ = 450 nm gemessen und die Anzahl an gewanderten Zellen mittels der Standardreihe ermittelt werden.
Als Membran wurden Polycarbonat-Membranen mit einer Porengröße von 3 µm verwendet, deren Oberfläche mit Polyvinylpyrrolidone (PVP) behandelt wurde. Die PVP-Beschichtung sorgt für eine hydrophile Oberfläche der Membran, an der neutrophile Granulozyten nicht adhärieren können. Dies erlaubt, dass sich die Zellen nach dem Durchwandern von der Membran lösen und im unteren Kompartiment gesammelt werden können. Dieser Prozess wird zusätzlich durch die unterschiedliche Beschaffenheit der Oberfläche der Polycarbonat-Membran unterstützt. Die glatte Seite der Membran lässt keine Adhäsion der Zellen zu, während die raue Seite ein Anheften von Zellen begünstigt.

Durchführung

Die Polycarbonat-Membranen wurden zunächst für 10 min mit 96% Ethanol und nachfolgend für 10 min mit Ethanolischer Natronlauge behandelt. Anschließend erfolgten Waschschritte von 2 x 4 min und 1 x 3 min mit Wasser bevor die Membran für weitere 10 min mit Phosphatpuffer äquilibriert und getrocknet wurde.
Vor ihrer Verwendung wurde der untere Teil der Chemotaxiskammer sowie alle mit den Stimuli in Berührung kommenden Gefäße für 1 h bei 37°C mit Blockingpuffer behandelt und nachfolgend bei 60°C getrocknet. Parallel zur Vorbereitung der Chemotaxiskammern erfolgte

die Präparation der neutrophilen Granulozyten aus humanem Vollblut wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Die Zellkulturüberstände wurden auf Eis aufgetaut, mit einer seriellen 1:3-Verdünnung mit PBS-D (mit Ca^{2+},Mg^{2+}) + 0,1% BSA ausverdünnt und in das untere Kompartiment der Chemotaxiskammer pipettiert. Als Positivkontrolle für die Migration der Neutrophilen diente fMLP (10 nM), ein starker Chemoattraktant für neutrophile Granulozyten. Alle Ansätze wurden in Duplikaten durchgeführt. Die untere Kammer wurde mit 28-30 µL Stimulus pro Vertiefung beladen, sodass ein leicht positiver Meniskus entstand. Anschließend erfolgte das Auflegen der Membran (mit der glatten, glänzenden Seite nach unten) und der vollständige Zusammenbau der Chemotaxiskammer.
Nach Anwärmen der Chemotaxiskammer auf 37°C wurde überschüssige, durch die Membran in die obere Kammer getretene Flüssigkeit vorsichtig abgenommen. Die präparierten neutrophilen Granulozyten wurden mit einer Zellkonzentration von $2x10^6$ Zellen/mL in PBS-D (o. Ca^{2+},Mg^{2+}) + 1% BSA aufgenommen und für 10 min im 37°C-Wasserbad vorgewärmt. In einigen Ansätzen wurde der C5a-Rezeptor mittels des Inhibitors W-54110 blockiert. Dazu wurden die Zellen unter Zugabe von 10 µM dieses C5a-Rezeptor-Inhibitors oder einer äquivalenten Konzentration des Solvents DMSO in PBS-D (o. Ca^{2+},Mg^{2+}) + 1% BSA für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von final 0,9 mM $CaCl_2$ und 0,5 mM $MgCL_2$ zu allen Ansätzen wurden 50 µL der jeweiligen Zellsuspensionen in das obere Kompartiment gegeben und die Chemotaxiskammer für 1 h bei 37°C inkubiert. In der oberen Kammer verbliebene Zellen wurden anschließend entfernt und die gewanderten Zellen aus der unteren Kammer in eine 96-Well-Rundbodenplatte überführt.

Nach Übertragung der migrierten Zellen aus der Chemotaxiskammer auf die Rundbodenplatte wurden restliche Zellen aus den Vertiefungen der unteren Kammer mit 0,1% Hexabromid-Lösung (25 µL/Vertiefung) lysiert und in die entsprechenden Vertiefungen auf der Rundbodenplatte übertragen. Die Proben wurden dann seriell in 1:2-Schritten in PBS-D + 0,1% BSA ausverdünnt und die Anzahl der gewanderten Zellen über ihren Gehalt an endogener Myeloperoxidase (MPO) bestimmt. Dazu wurde jeder Probe 50 µL des gelösten MPO-Substrates TMB zugesetzt und die Extinktion bei λ = 450 nm (Referenzwellenlänge: λ = 620 nm) gemessen. Eine Verdünnungsreihe aus dem Lysat einer definierten Zellmenge diente als Standard. Zur weiteren Auswertung der Messdaten wurde das Programm GraphPad Prism 5.0 verwendet.

2.4 Immunfluoreszenzanalytische Verfahren

2.4.1 Färbung von Oberflächenmolekülen für die Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Emission von optischen Signalen einer Zelle, während diese einen Laserstrahl passiert. Streulichtsignale unveränderter Wellenlänge geben dabei Auskunft über Größe und Dichte der Zelle. Während das Vorwärtsstreulicht (in einem Winkel von bis zu 10° detektiert) eine Aussage über die Größe der Zelle ermöglicht, verhält sich das Seitwärtsstreulicht (in einem Winkel von 90° detektiert) proportional zur optischen Dichte der Zelle, die wiederum von deren Granularität abhängig ist. Auf diese Weise können bestimmte Zellpopulationen anhand ihrer Größe und Granularität in einem Zellgemisch identifiziert werden.

Die Markierung der Zelle mit einem Fluorochrom-gekoppelten, spezifischen Antikörper liefert zusätzlich ein Fluoreszenzsignal (in einem Winkel von 90° detektiert), welches ebenfalls die Identifizierung bestimmter Zellpopulationen ermöglicht. Dabei wird das Fluorochrom von Licht einer definierten Wellenlänge angeregt und emittiert Licht einer spezifischen Wellenlänge, das von einem Photodetektor registriert wird.

Jede Zelle wird als einzelnes Ereignis detektiert und gespeichert.

2.4.1.1 Färbung neutrophiler Granulozyten im murinen Vollblut

Aliquots (30 µl) von frisch abgenommenem murinen Citrat-Blut wurden in Polycarbonatröhrchen verteilt und nachfolgend die Erythrozyten durch eine 1:10-Verdünnung mit Lysepuffer (5 min, RT, dunkel) entfernt. Nach dem Abzentrifugieren (300xg, 5 min, RT) der Zellen wurde der Lysepuffer mit den Erythrozyten-Resten abgesaugt und die im Sediment verbliebenen Leukozyten mit kaltem PBS-D + 0,1 % BSA gewaschen (Zentrifugation: 300xg, 5 min, 8°C).

Der Anteil neutrophiler Granulozyten im murinen Vollblut wurde anhand ihrer charakteristischen Position im Seitwärtsstreulicht und ihrer Expression der Oberflächenproteine Ly-6C und Ly-6G mittels des Antikörpers des Klones NIMP-R14 in der Durchflusszytometrie bestimmt. Die Identität dieser Population wurde in einzelnen Ansätzen durch Verwendung des gegen Ly-6G gerichteten Antikörpers des Klones 1A8 überprüft. Dazu erhielten die Proben 0,5 µg des unkonjugierten Primärantikörpers verdünnt in 50 µL PBS-Azid + 3% humanes Serum während Kontrollansätze keinen Antikörper oder Antikörper einer entsprechenden Isotypkontrolle (Klon RTK2758) erhielten. Nach einer Inkubationszeit von 30 min (8°C, dunkel) wurden die Zellen gewaschen (Zentrifugation: 600xg, 5 min, 8°C)

und mit 0,5 µg des AlexaFluor488-konjugierten Sekundärantikörpers verdünnt in 100 µL PBS-Azid + 3% humanes Serum inkubiert (20 min, 8°C, dunkel). Anschließend wurden die Proben mit PBS-Azid gewaschen, in 300 µL PBS-Azid aufgenommen und entweder sofort im Durchflusszytometer (FACS Calibur) gemessen (10.000 Ereignisse) oder mit 4% PFA fixiert und bis zur Messung im Kühlschrank gelagert. Die weitere Auswertung erfolgte mithilfe des FCS Express 4 Flow Cytometry-Programms (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA).

2.4.1.2 Färbung der Oberflächenmoleküle CD16, CD32 und CD64 auf humanen Hautmastzellen

Die Expression der Fcγ-Rezeptoren CD16, CD32 und CD64 auf humanen Hautmastzellen sowie gebundenes humanes IgE wurde durch spezifische Antikörper (Klone 3G8, AT10, 10.1 bzw. polyklonales Antiserum gegen humanes IgE) in der Durchflusszytometrie nachgewiesen. Die Mastzell-Population wurde anhand ihrer charakteristischen Position im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht identifiziert und die Expression der Oberflächenproteine anhand des Fluorszenzsignals auf diesen Zellen ermittelt.
Dazu wurden die Mastzellen auf Polycarbonatröhrchen aufgeteilt und mit 0,5 µg des unkonjugierten Primärantikörpers verdünnt in 50 µL PBS-Azid + 3% humanes Serum inkubiert, während Kontrollansätze keinen Antikörper oder Antikörper einer entsprechenden Isotypkontrolle (Klon MOPC-21 bzw. irrelevantes Ziegenserum) erhielten. Nach einer Inkubationszeit von 30 min (8°C, dunkel) wurden die Zellen gewaschen (Zentrifugation: 600xg, 5 min, 8°C) und erhielten 0,5 µg des entsprechenden DTAF-konjugierten Sekundärantikörpers verdünnt in 100 µL PBS-Azid + 3% humanes Serum (20 min, 8°C, dunkel). Anschließend wurden die Proben mit PBS-Azid gewaschen, in 300 µL PBS-Azid aufgenommen und sofort im Durchflusszytometer (FACS Calibur) gemessen (3.000 Ereignisse). Die weitere Auswertung erfolgte mithilfe des FCS Express 4 Flow Cytometry-Programms (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA).

2.4.2 Quantifizierung von Zytokinen im Serum

Prinzip

Für die Quantifizierung von Zytokinen im murinen Serum wurde das *Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Assay (23-plex)*-Kit (Bio-Rad) verwendet und nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dieses Zytokin-Bead-Array System (Bioplex) erlaubt die simultane Detektion von 23 murinen Zytokinen: IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17A, Eotaxin, Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF), Granulocyte-

and Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF), IFN-γ, CXCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 und TNFα.

Diese Methode entspricht dem Prinzip des Sandwich-ELISA. Anstatt auf einer 96-Well-Platte befinden sich die Fangantikörper einer Spezifität hier jedoch auf der Oberfläche von 5,5 µm-großen Polystyren-Mikropartikeln, sogenannten Beads. Für jedes zu bestimmende Antigen gibt es eine Beadpopulation, die sich durch das Verhältnis ihrer beiden Fluoreszenzfarbstoffe von den anderen Populationen unterscheiden lässt. Während der Inkubation der Beadpopulationen mit der Probe oder dem Standard können die Fangantikörper ihr Antigen spezifisch binden. Als Detektionsantikörper, der ein anderes Epitop auf demselben Antigen erkennt, wird ein Biotin-gelabelter Antikörper verwendet, der im nächsten Schritt mit einem Streptavidin-Phycoerythrin(PE)-Konjugat interagiert. Zur Auswertung werden die Proben am Luminex-System gemessen. Dabei können über das Verhältnis der beiden Fluoreszenzfarbstoffe eines jeden Beads bis zu 100 Analyte gleichzeitig gemessen und unterschieden werden. Die Beads und das PE werden von einem Argon-Laser angeregt und emittieren Licht bei einer Wellenlänge von λ = 690 bzw. 570 nm. Die Intensität des Fluoreszenzsignals des PE steigt dabei proportional mit der Menge des gebundenen Antigens, sodass anhand der Standardkurven eine Quantifizierung des Antigens möglich ist.

Durchführung

Für die Bestimmung der Zytokine wurde der hoch verdünnte Standard (High PMT setting) eingesetzt. Die Proben wurden zunächst auf eine Rundbodenplatte überführt und mit Sample Diluent 1:4 verdünnt. Nach Zugabe der Antikörper-konjugierten Beads, der Biotin-konjugierten Detektionsantikörper und des PE-markierten Streptavidins wurden die Daten am Luminex-System gemessenen, mit der Bio-Plex Manager™ 5.0 Software verarbeitet und die erhaltenen Messdaten mithilfe des GraphPad Prism 5.0-Programms (Bio-Rad Laboratories Inc., München, Deutschland) ausgewertet.

2.5 Molekularbiologische Methoden

Die Genexpressionsanalysen wurden mit humanen Hautmastzellen gesunder Spender durchgeführt. Nach Stimulation für vier Stunden (Abschnitt 2.2.2) erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA. Diese wurde bis zur Versendung an den Kooperationspartner (Prof. Dr. T. Buch und Dr. O. Prazeres da Costa am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Technische Universität München) bei –80°C gelagert. Markierung, Hybridisierung und die weitere Auswertung wurden vom Kooperationspartner durchgeführt.

2.5.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus stimulierten humanen Hautmastzellen

Nach Stimulation der Mastzellen ($5x10^5$ Zellen/Ansatz) für vier Stunden wurden die Zellen aus der Kulturplatte in ein RNAse-freies 1,5 mL-Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zentrifugation (300xg, 10 min, RT) wurden die Zellsedimente auf Eis überführt und die RNA mithilfe des *High Pure RNA Isolation*-Kits isoliert.

Dazu wurden die Zellen in 150 µL PBS-D resuspendiert und dann mit 300 µL Lysis/-Binding Buffer für 15 sec unter Schütteln lysiert. Das so erhaltene Lysat wurde direkt auf eine High Pure Filtersäule übertragen, an deren Glasfasern die Nukleinsäuren während der Zentrifugation (8.000xg, 30 sec, RT) banden. Der Durchlauf wurde verworfen. Dann erfolgte der Verdau der auf der Säulenmembran befindlichen DNA mit 95 µL DNase I-Inkubationsmix (10 µL DNase I + 90 µL DNase Incubation Buffer) für 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die an die Filtersäule gebundenen Nukleinsäuren mit 500 µL Waschpuffer I, einem speziellen Inhibitor Removal Puffer, gewaschen und so von RT-PCR-inhibierenden Kontaminationen befreit. Die zurückgebliebene, intakte Gesamt-RNA wurde noch einmal mit 500 µL Waschpuffer II (Zentrifugation: 8.000xg, 30 sec, RT), und einmal mit 200 µL Waschpuffer II (Zentrifugation: 13.000xg, 2 min, RT) gewaschen, um restliche Salze, Proteine und andere zelluläre Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurde die Gesamt-RNA mit 50 µL Elution Buffer von der Säule eluiert (Zentrifugation: 8.000xg, 1 min, RT).

Direkt im Anschluss erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration am Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von λ = 260 nm, um dann sofort 400 ng RNA für die Microarray-Analyse aliquotieren zu können. Das Probenmaterial wurde bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

2.5.2 Messung der RNA-Qualität und -Quantität

Bestimmung der RNA-Quantität mithilfe des NanoDrop-Spektrophotometers

Das NanoDrop ist ein Spektrophotometer mit dessen Hilfe kleinste Probenmengen innerhalb weniger Sekunden auf ihre DNA-, RNA- oder Proteinkonzentration untersucht werden können.

Die Reinigung vor und nach dem Messen sowie die Initialisierung des Geräts und der Geräte-Software erfolgten mit Nuklease-freiem Wasser. Für die Kalibirierung des Nullpunktes und deren Überprüfung wurde der Elution Buffers aus dem *High Pure RNA Isolation*-Kit verwendet. Wenn dieser eine Konzentration von 0 ng/µL aufwies, wurde mit den Proben (2 µL) fortgefahren und die Daten am Ende ausgedruckt.

Bestimmung der RNA-Qualität mithilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers

Prinzip

Für die Auswertung der RNA-Qualität am Agilent 2100 Bioanalyzer wurde das *Agilent RNA Nano 6000* Kit verwendet. Die hier enthaltenen *Eukaryote total RNA Nano-Chips 6000* besitzen miteinander verbundene Mikrokanäle, die für die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten (also Auftrennung nach Größe) auf einem Gel notwendig sind. Die entstehenden Banden werden mithilfe des im Gel enthaltenen Farbstoffs vom Gerät erkannt und die Fragmentgröße durch Abgleich mit dem mitlaufenden Standard ermittelt. Zwei saubere Banden bei 16S und 28S ohne Degradationsprodukte stehen für eine gute RNA-Qualität und werden mit der RNA Integrity Number (RIN) ausgedrückt. Auf einer Skala von 0 bis 10 steht die RIN von 8 bis 10 für gute Qualität der RNA und geringste Kontamination und Degradation. Für weitergehende Untersuchungen wurden nur Proben mit einer RIN ≥ 8 verwendet.

Durchführung

Vor Beginn wurden alle Reagenzien für 30 min auf Raumtemperatur gebracht. Der aliquotierte, hitzeinaktivierte RNA-Standard wurde zusammen mit den Proben auf Eis aufgetaut und letztere anschließend für 2 min bei 70°C denaturiert. Die *RNA 6000 Nano Gelmatrix* wurde zunächst filtriert, mit 1 µL *RNA 6000 Nano dye*-Konzentrat gemischt und nach Zentrifugation mithilfe der Ladestation auf den Chip aufgetragen. Anschließend wurden Proben und *RNA 6000 Nano Marker* oder vorbereiteter *RNA-Standard* auf den Chip geladen. Nach der Beladung erfolgte die Messung im Bioanalyzer und die Auswertung der Daten mithilfe der 2100 Expert Software (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA; USA).

2.5.3 RNA-Genexpressionsanalyse durch DNA-Microarrays (Durchführung durch Kooperationspartner in München)

Für die Untersuchung der Genexpressionsmuster von humanen Hautmastzellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen wurde der Oligonukleotid-Microarray *Human Gene 1.0 ST* von Affymetrix verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Chip mit 764.885 verschiedenen Sonden zum Nachweis von 28.869 umfassend beschriebenen humanen Genen. Die Durchführung des Arrays sowie die Analyse der Rohdaten erfolgten im Rahmen einer Kooperation mit Frau Dr. Olivia Prazeres da Costa vom Expression Core Facility an der TU München.

Humane Hautmastzellen von drei verschiedenen, gesunden Spendern wurden stimuliert (Abschnitt 2.2.2) und die Gesamt-RNA isoliert (Abschnitt 2.5.1). Die so gesammelten RNA-Proben wurden auf Trockeneis verschickt.
Das RNA-Material wurde mithilfe des *WT Expression*-Kits erst in cDNA überschrieben und diese dann amplifiziert. Unter Verwendung des *GeneChip® Terminal Labeling*-Kits erfolgte die Fragmentierung der einzelsträngigen cDNA und ihre Markierung durch terminale Biotinylierung. Die Hybridisierung der markierten Proben mit den *Human Gene 1.0 ST* GeneChips erfolgte ü.N. bei 45°C. Die genaue Durchführung erfolgte entsprechend den Hersteller-Angaben der verwendeten Kits.
Zur quantitativen Auswertung der Genexpression wurde das Programm DChip (Heng Li Lab, Center for Life Sciences, Boston, MA, USA) verwendet.

2.5.4 Genotypisierung der Cre/iDTR-Mäuse

Die für die Genotypisierung verwendete DNA wurde aus dem beim Ohrstanzen anfallenden Hautgewebe mithilfe des *DNeasy 96 Blood and Tissue*-Kits bzw. *REDExtract-N-Amp Tissue PCR*-Kit entsprechend den Hersteller-Angaben isoliert und bei –20°C gelagert.
Zum Nachweis des Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR)-Gens wurden die Primer *iDTR-UP1* und *iDTR-DO* verwendet, um 450 Basenpaar (bp)-Fragmente zu amplifizieren. Um das Gen der Cre-Rekombinase und dessen Position direkt hinter dem Mastzellprotease 5 (Mcpt5)-Promotor nachzuweisen, wurde das Primer-Paar *Mcpt5-Cre-UP* und *CreSeq1b-DO* benutzt, wodurch ein 554 bp-großes DNA-Fragment entsteht. Um gleichzeitig zu zeigen, dass das *Mcpt5*-Gen trotz der genetischen Manipulation noch unter der Kontrolle des Mcpt5-Promotors steht, wurde zusätzlich der *Mcpt5-Ex1-DO3*-Primer zugegeben. Zusammen mit *Mcpt5-Cre-UP* als forward-Primer wurde somit ein 250 bp-großes DNA-Fragment amplifiziert, das gleichzeitig als interne Kontrolle der PCR für die Probe diente.
Beide PCR-Läufe (**Tab. 2.1**) wurden mit dem *DreamTaq™DNA-Polymerase*-Kit bzw. *REDExtract-N-Amp Tissue PCR*-Kit) angesetzt. Jeder Ansatz bestand aus 1x DreamTaq™ Puffer inkl. $MgCl_2$ (1:10), 200 µM dNTPs, 0,5 µM je Primer und dem Enzym Taq-Polymerase (1:200) und wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf 20 µL aufgefüllt.

Die PCR-Produkte wurden auf ein 4%iges Agarose-Gel, welches mit Roti®-Safe GelStain als DNA-bindende Farbsubstanz versetzt wurde, aufgetragen und für 45-60 min bei 70 V laufen gelassen. Die Banden im Gel wurden mithilfe einer UV-Lampe sichtbar gemacht und für die Auswertung fotografiert.

Tab. 2.1: Verwendete PCR-Programme:

Mcpt5-Cre

95 °C	5 min	
95 °C	45 sec	29 x
57 °C	1 min	
72 °C	45 sec	
72 °C	7 min	
10 °C	Ende	

DTR

95 °C	5 min	
95 °C	45 sec	12 x
56 °C	1 min	
72 °C	1 min	
95 °C	45 sec	17 x
52 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
10 °C	Ende	

2.6 Tierexperimentelle Verfahren

Alle durchgeführten Tierversuche wurden von der Tierschutz-Ethikkommission des Umweltministeriums in Kiel begutachtet und genehmigt (V 312-72241.123-3 (94-9/08) bzw. (71-5/12)).

2.6.1 Depletion der Bindegewebs-Mastzellen in den *Mcpt5-Cre iDTR*-Mäusen

Die spezifische Depletion der Bindegewebs-Mastzellen in den *Mcpt5-Cre iDTR*-Mäusen wurde wie von Dudeck *et al.*[119] beschrieben durchgeführt. Dazu erhielten die Tiere vor dem eigentlichen Versuchsbeginn im wöchentlichen Abstand insgesamt 4 x 25ng/g KG Diphtherietoxin (DT) i.p. (*Mcpt5-Cre iDTR*+DT-Tiere), während Kontrolltiere eine entsprechende Menge des Solvents PBS-D (PBS) bekamen (*Mcpt5-Cre iDTR*+PBS -Tiere). Den im lokalen Modell der EBA eingesetzten Mäusen wurden zusätzlich zwei intradermale Injektionen mit je 5 ng/g KG DT in die Ohrbasis (Tag 6 und 2 vor Versuchsbeginn) appliziert. Nach der ersten Injektion von DT kommt es zu einem massiven Absterben der Mastzellen, welches von einer partiellen Degranulation dieser Zellen begleitet wird und bei etwa 20% der Tiere zum Tode führen kann. Dies wurde durch eine einmalige Gabe des H1-Antagonisten Pyrilamin (5 µg/g KG) verhindert, welcher parallel zur Erstinjektion des DT i.p appliziert wurde. Obwohl eine einmalige Applikation des Antagonisten vier Wochen vor dem eigentlichen Experiment als bedenkenlos angesehen wird, erhielten die PBS-behandelten *Mcpt5-Cre iDTR*-Tiere ebenfalls eine entsprechende Menge dieser Substanz.

Für die Überprüfung der erfolgreichen Depletion der Mastzellen wurde die Zahl der residuellen Mastzellen im Gewebe ermittelt. (Abschnitt 2.7.4).

2.6.2 Induktion einer passiven, systemischen EBA

Alle verwendeten Seren wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Ludwig in der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie in Lübeck zur Verfügung gestellt.

Zur Induktion einer experimentellen EBA wurde das von Sitaru *et al.*[61] beschriebene Transfermodell verwendet, welches leicht modifiziert wurde. Dazu wurde aus Seren, von mit murinem Typ VII Kollagen (mCOL7) sensibilisierten Kaninchen, IgG mittels Protein G-Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend sterilfiltriert. Dieses wurde den Mäusen subkutan (s.c.) im Abstand von jeweils 2 Tagen injiziert (**Abb. 2.2**). Die Injektionen wurden an den Tagen 0, 2, 4, 6, 8 und 10 durchgeführt und die jeweilige Antikörpermenge betrug 25 µg/g KG (Antikörperkonzentration: 5 mg/mL; Verdünnung in Aqua dest). Mäuse in den Kontrollgruppen erhielten identische Antikörperkonzentrationen von unbehandelten Kaninchen (irrelevantes IgG).Somit bestand jedes Experiment aus 4 Untersuchungsgruppen:

1. Wildtyp-Stamm + irrelevantes Kaninchen IgG (Isotyp)
2. Mastzell-defizienter Stamm + irrelevantes Kaninchen IgG (Isotyp)
3. Wildtyp-Stamm + amCOL7
4. Mastzell-defizienter Stamm + amCOL7

Als Wildtyp-Stämme wurden C57BL/6 $Kit^{+/+}$; WBB6F1 $Kit^{+/+}$ bzw. *Mcpt5-Cre iDTR* + PBS eingesetzt und als Mastzell-defiziente Stämme C57BL/6 $Kit^{W\text{-}sh/W\text{-}sh}$; WBB6F1 $Kit^{W/W\text{-}v}$; *Mcpt5-Cre iDTR* + DT.

Jeder Mausstamm wurde in zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei (Isotyp) bzw. sechs (amCOL7-IgG) Tieren pro Versuchsgruppe untersucht.

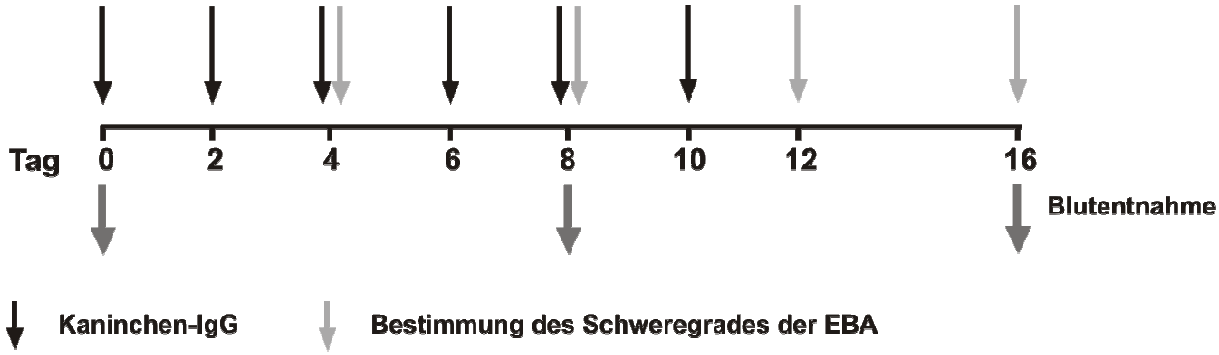


Abb. 2.2: Versuchsschema der Induktion einer systemischen EBA

Eine klinische Untersuchung der Tiere in Narkose (frisch angesetztes 2 µg/g KG Xylazin und 94 µg/g KG Ketamin) erfolgte an den Tagen 4, 8, 12 und 16 und wurde schriftlich und fotografisch dokumentiert. An Tag 0 und 8 wurde ferner eine Blutentnahme durch Punktion der Schwanzvene vorgenommen (Gelröhrchen; entnommenes Blutvolumen 25-60 µL). An Tag 16 wurde der Versuch beendet und die Tiere in Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Entnahme von Blut aus dem Herzen (entnommenes Blutvolumen 400-500 µL) zur Bestimmung der Serumspiegel verschiedener Zytokine (Abschnitt 2.4.2). Darüber hinaus wurden am Endpunkt dieser Experimente der klinische Schweregrad berechnet (Abschnitt 2.6.5) und Hautproben von verschiedenen Körperregionen zur histologischen Aufarbeitung (Kryo- und Paraffineinbettung; Abschnitte 2.7.1 und 2.7.2) und für weiterführende Analysen entnommen.
Die Blutproben wurden zunächst auf Eis gelagert und dann zur Serum-Gewinnung bei 13.000xg (Anlauf 9, Bremse 7) für 2 min zentrifugiert. Das Serum wurde anschließend aliquotiert und bei –20°C gelagert. Für die Bestimmung der Neutrophilen (Abschnitt 2.4.1.1) wurde abgenommenes Blut 1:5 mit 3,8% Citrat verdünnt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

Als **Abbruchkriterien,** die ein Entfernen eines Tieres aus dem Experiment und dessen Tötung vorschreiben, wurden beim systemischen EBA-Modell große, offene Infektionen der Haut, hochbeiniger Gang der Tiere, mehr als 20% Gewichtsverlust und chronische Sträubung des Fells festgelegt.

2.6.3 Induktion einer passiven, lokalen EBA

Die Induktion einer lokalen experimentellen EBA wurde mit den bereits für das systemische Modell der EBA beschriebenen Antikörpern durchgeführt (Abschnitt 2.6.2). An Tag 0 wurde

der Antikörper den Mäusen einmalig in Narkose (frisch angesetztes 2 µg/g KG Xylazin und 94 µg/g KG Ketamin) intradermal in die Ohrbasis des rechten oder linken Ohres injiziert (**Abb. 2.3**). Als Kontrolle wurde das andere Ohr mit irrelevantem Serum (IgG nicht-immunisierter Kaninchen) behandelt. Das jeweilige Injektionsvolumen betrug 30 µL (0,6 mg Antikörper).

Auch alle nachfolgenden Schritte wurden am narkotisierten Tier durchgeführt. An den Tagen 1 und 2 erfolgte eine klinische Untersuchung der Tiere, in deren Rahmen der prozentuale Anteil des Befalls nur am Ohr bestimmt und zusätzlich durch Fotografien dokumentiert wurde. Die Beurteilung des Krankheitszustandes fand im Vergleich zu dem mit Kontrollantikörper behandelten Ohr statt.

An Tag 0 wurde ferner eine Blutentnahme durch Punktion der Schwanzvene vorgenommen (entnommenes Blutvolumen 25-50 µL). Nach einem Beobachtungszeitraum von 48 Stunden (= Tag 2) wurde der Versuch beendet und die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte eine weitere Blutentnahme durch Punktion des Herzens (entnommenes Blutvolumen 500-600 µL) und die Entnahme von Hautproben zu weiterführenden histologischen Analysen. Die Abbruchkritierien des Experiments entsprachen denen des systemischen Ansatzes.

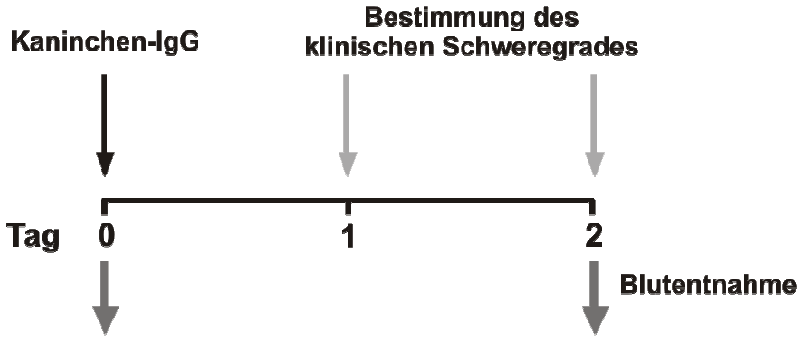


Abb. 2.3: Versuchsschema der Induktion einer lokalen EBA

Dieses Experiment wurde in zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils zehn Tieren pro Versuchsgruppe durchgeführt und bestand aus folgenden Versuchsgruppen:

1. *Mcpt5-Cre iDTR*+PBS (Mastzell-kompetent)
   + irrelevantes Kaninchen IgG (Isotyp; linkes Ohr)
   + amCOL7 (rechtes Ohr)
2. *Mcpt5-Cre iDTR*+DT (Mastzell-defizient)
   + + irrelevantes Kaninchen IgG (Isotyp; linkes Ohr)
   + amCOL7 (rechtes Ohr)

2.6.4 Bestimmung der Ödembildung in der lokalen EBA

Die Bildung von Ödemen wurde qualitativ und quantitativ über die Extravasation des Farbstoffes Evans Blue bestimmt.[137] Die Induktion der Krankheit erfolgte analog zu dem in 2.6.3 beschriebenen Vorgehen. Zusätzlich wurde allen Mäusen 15 Minuten vor Applikation des Antikörpers Evans Blue (1% in PBS-D; 200 µL) in die Schwanzvene injiziert. Nach einem Beobachtungszeitraum von 60 min wurde die Verfärbung der Ohren fotografisch dokumentiert, die Tiere in Narkose durch zervikale Dislokation getötet und die Ohren als Gewebeproben entnommen. Pro Gruppe wurden die Ohren von acht Mäusen histologisch aufgearbeitet, während die Ohren der anderen Mäuse der Extraktion des Farbstoffes und dessen photometrischer Quantifizierung dienten.

Das Experiment bestand aus zwei Versuchsgruppen, die alle mit Evans Blue behandelt wurden:

1. *Mcpt5-Cre iDTR*+PBS (Mastzell-kompetent)
   + irrelevantes Kaninchen IgG (Isotyp; linkes Ohr)
   + amCOL7 (rechtes Ohr)
2. *Mcpt5-Cre iDTR*+DT (Mastzell-defizient)
   + irrelevantes Kaninchen IgG (Isotyp; linkes Ohr)
   + amCOL7 (rechtes Ohr)

Extraktion des Evans Blue-Farbstoffes aus dem Gewebe

Nach ihrer Entnahme wurden die Ohren separat offen in Aluminiumfolie gelegt und im Trockenschrank für 2 Tage bei 60°C getrocknet. Um den Farbstoff aus dem Gewebe zu lösen, wurde anschließend jedes Ohr mit 8 mL Formamid/g Trockengewicht in Eppendorf-Gefäße für 2 Tage bei 60°C inkubiert. Das Extrakt wurde in ein neues Gefäß transferiert und bis zur photometrischen Quantifizierung bei 4°C gelagert. Zur Herstellung der Standardkurve wurde eine definierte Menge Evans Blue in Formamid gelöst und in sieben Verdünnungsstufen einer seriellen 1:2-Verdünnung auf eine 96-Well-Platte aufgetragen (100 µL/Vertiefung). Die Standardkonzentrationen wurden dabei so gewählt, dass die Farbintensitäten der Proben abgedeckt waren. Anschließend erfolgte die Extinktionsmessung am Mikrotiterplattenphotometer bei einer Wellenelänge von $\lambda = 620$ nm und die weitere Auswertung der Messdaten mithilfe der GraphPad Prism 5.0-Software.

2.6.5 Bestimmung des klinischen Schweregrades der Erkrankung

Der klinischen Schweregrad wurde mit Hilfe eines von Sitaru *et al.*[61] beschriebenen Verfahrens bestimmt. Dazu wurde in narkotisierten Mäusen die Fläche der erkrankten Haut, charakterisiert als Haarausfall, Schorf, Rötung und Ablösung der Epidermis (Blasenbildung), im Verhältnis zur Gesamtoberfläche in definierten Hautregionen bestimmt. Um den Gesamtbefall eines Tieres zu errechnen, wurde anschließend den einzelnen Körperpartien ihr prozentualer Anteil an der Gesamtgröße des Tieres zugeordnet, dieser Anteil mit dem prozentualen Befall des Körperteils multipliziert und schließlich zum Gesamtbefall (= klin. Schweregrad) aufaddiert. Dieser Wert berücksichtigt damit die Größe der einzelnen Körperregionen und relativiert deren prozentualen Befall in der Berechnung. Zur Minimierung von subjektiven Fehlern erfolgte die Beurteilung verblindet durch eine zweite Person.
Demnach lautet die Berechnung des klinischen Schweregrades als Formel geschrieben wie folgt:

$$Klin.Schweregrad = A * 0{,}025 + B * 0{,}025 + C * 0{,}005 + D * 0{,}005 + E * 0{,}05 + F * 0{,}09 + G * 0{,}1 + H * 0{,}4 + I * 0{,}05 + J * 0{,}05 + K * 0{,}1 + L * 0{,}1$$

Dabei entspricht *A* bis *L* dem jeweilen prozentualen Befall des linken Ohres (*A*), rechten Ohres (*B*), linken Auges (*C*), rechten Auges (*D*), der Schnauze (*E*), des Kopfes/Nackens (*F*), Schwanzes (*G*), Rumpfes (*H*), linken Vorderbeins (*I*), rechten Vorderbeins (*J*), linken Hinterbeins (*K*) und rechten Hinterbeins (*L*).

2.7 Histologische Methoden

Für die Verwendung in der Histologie wurde das Hautgewebe enthaart und vor der Einbettung von Fettgewebe befreit.

2.7.1 Paraffin-Gewebeschnitte

Die Einbettung des Gewebes in Paraffin wurde entsprechend etablierter Protokolle durchgeführt.[138,139]
Das Gewebe wurde direkt nach der Entnahme für 24 Stunden in 4% Paraformaldehyd (PFA) bei 4°C fixiert, dann in Einbettkassetten (Histosetten) in 4% Formalin gelegt und anschließend mithilfe eines Gewebeprozessors (Autotechnikon) ü.N. automatisiert in Paraffin eingebettet. Dabei wurden die Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert

(70% > 80% > 90% > 96% > 3 x 100% Ethanol, jeweils 1 Stunde), dann in Xylol als Intermedium überführt (zweimal je 1,5 Stunden) und am Ende mit flüssigem Paraffin (60°C) durchtränkt (zweimal je 2 Stunden). Die fertigen Proben wurden schließlich an der Gießstation in Paraplast Plus gegossen und als Paraffinblöcke auf den Einbettkassetten befestigt.

Zum Anfertigen von 3 µm-dicken Paraffinschnitten wurde das Mikrotom SM 2000R mit A35-Einmalklingen verwendet. Die Schnitte wurden zum Strecken in ein 20°C-Wasserbad gegeben, anschließend auf die Objektträger gebracht und im 45°C-Wasserbad geglättet, bevor sie auf einer 37°C-Heizplatte getrocknet wurden. Die Lagerung der Paraffin-Blöcke wie auch der -Schnitte erfolgte bei Raumtemperatur.

2.7.2 Kryo-Gewebeschnitte

Die für die Gefrierschnitte vorgesehenen Einbettschälchen wurden mit dem Einbettmedium O.C.T Compound befüllt, worin anschließend die Hautprobe senkrecht und luftblasenfrei aufgestellt wurde. Die eingebetteten Proben wurden sofort im flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei –80°C gelagert.[139]

Die Kryo-Blöcke wurden am Cryo-Mikrotom CM 3000 mit C35-Einmalklingen in 6 µm-dicke Gefrierschnitte geschnitten und bis zur Verwendung bei –80°C gelagert.

2.7.3 Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase Färbung

Prinzip

Neutrophile Granulozyten und Mastzellen lassen sich in Paraffinschnitten enzymatisch über die in den Granula dieser Zellen enthaltenen Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase darstellen. Für diese Methode wurde das Naphthol AS-D Chlorazetat-Kit verwendet, das auf dem Verfahren von Gomori[140] und den Modifikationen durch Burstone[141] beruht. Durch Hydrolyse setzt die Esterase ihr Substrat Naphthol AS-D Chlorazetat in freie Naphtholverbindungen um, die mit Diazoniumsalzen zu einem wasserunlöslichen rotvioletten Azofarbstoff reagieren und das Zytoplasma der Chlorazetat-Esterase-speichernden Zellen pink/dunkelviolett anfärbt. Anhand der Zellmorphologie lassen sich Mastzellen als große Zellen mit rundem Zellkern von den deutlich kleineren Granulozyten mit gelapptem Zellkern differenzieren.

Durchführung

Vor Beginn der eigentlichen Färbung wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert, indem sie zweimal 10 min in Xylol gestellt und dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100% - 96% - 70% Ethanol) und Wasser gespült wurden.

Um die für die spätere Farbreaktion benötigten Diazoniumsalze frisch zu bilden, wurden zunächst 100 µL Natriumnitrit-Lösung mit 100 µL Fast Red Violet Standard-Lösung durch Schwenken gemischt und 2 min bei RT stehen gelassen. Durch Zugabe von 4 mL Wasser (37°C), 500 µL TRIZMAL und 100 µL Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Lösung wurde die Färbelösung komplettiert und färbte sich rot. Die Schnitte wurden damit vollständig bedeckt und für 3 Stunden bei 37°C in einer Feuchtkammer dunkel inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in Wasser gewaschen und ohne zu trocknen mit der fertigen Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt (2 min, RT). Um einen Farbumschlag des Hämatoxylins von rot zu blau zu erhalten, wurden die Proben gründlich mit warmem Leitungswasser gewaschen und erst danach mit Wasser gespült, bevor sie mit flüssiger Kaisers Glyceringelatine (37°C) eingedeckt wurden.

2.7.4 Histologische Bestimmung der Mastzellzahl

Für die histologische Bestimmung der Mastzellzahl/mm^2 Haut in den *Mcpt5-Cre iDTR*-Mäusen wurden pro Maus und Hautregion drei Paraffinschnitte der Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase-Färbung (Abschnitt 2.7.3) unterzogen. Um die Mastzellen im Gewebe leichter erkennen und zählen zu können, wurden die Schnitte jedoch nur 1 h statt 3 h mit der Färbelösung inkubiert und das Gewebe anschließend nicht mit der Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt. Für jeden Schnitt wurden dann die Mastzellzahl ausgezählt und die Gewebefläche mithilfe der NIS Elements Microscope Imaging Software (Nikon, Düsseldorf; Deutschland) am Mikroskop bestimmt und daraus die Mastzellzahl/mm^2 Haut errechnet.

2.7.5 Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung

Im Gewebe immobilisiertes IgG und der Komplementfaktor C3 wurden über Immunfluoreszenz simultan in Gefrierschnitten nach Modifikation einer Methode von Sitaru *et al.*[61] nachgewiesen.

Dazu wurden die Schnitte bei Raumtemperatur aufgetaut, getrocknet und mit 1x Roti-Immunoblock-Gebrauchslösung blockiert (30 min, RT), um unspezifische Hintergrundfärbungen zu minimieren. Als Verdünnungsmedium für alle Antikörper diente eine mit PBS 1:10-verdünnte 1x Roti-Immunoblock-Gebrauchslösung (= Roti-

Immunoblock/PBS). Nach dem Blockieren wurden die Schnitte in eine Feuchtkammer gelegt und mit einem Ratte-anti-Maus C3-Antikörper (5 µg/mL) für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschritte mit PBS auf dem Schüttler (jeweils 10 min, RT, dunkel) und die simultane Inkubation mit dem Sekundärantikörper AlexaFluor488-konjugierten anti-Ratte IgG (10 µg/mL) und dem DyLight649-konjugierten anti-Kaninchen IgG (5 µg/mL) für 30 min bei RT (dunkel). Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS (siehe oben) wurde die Flüssigkeit von den Objektträgern entfernt und die Schnitte mit DABCO eingedeckt. Da dieses Einbettmedium bei Raumtemperatur nicht erstarrt, wurden die Ecken des Deckglases mit Nagellack auf dem Objektträger fixiert. Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden vor und nach der mikroskopischen Auswertung bei -20 °C gelagert.

2.8 Statistik

Soweit nicht anders angegeben, wurden zunächst alle Datensätze mithilfe des *D'Agostino and Pearson omnibus normality Tests* auf eine vorliegende Normalverteilung getestet. Bei einer mehrheitlichen Normalverteilung der Stichproben wurde die statistische Analyse der Testgruppen mittels des zweiseitigen, unabhängigen *t-Tests* bzw. *One-way ANOVA* durchgeführt und als Posttest der *Bonferroni's Multiple Comparison Test* eingesetzt. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

Waren die Stichproben mehrheitlich nicht normalverteilt, erfolgte die Signifikanzprüfung mithilfe des *Mann-Whitney-* bzw. *Kruskal-Wallis-Tests.* Als Posttests wurde dabei der *Dunn's Multiple Comparison Test* (95 %-Konfidenzintervall) eingesetzt. Die Darstellung der Daten erfolgte als Boxplot unter Angabe der Mediane. Die obere und untere Begrenzung der Box gibt die 25- und 75-Perzentile an und umfasst damit den Interquartilsabstand. Die Länge der Antennen sind nach der Definition von John W. Tukey dargestellt, wonach sie eine Länge des 1,5-fachen des Interquartilsabstandes besitzen.[142]

Irrtumswahrscheinlichkeit (p) und Stichprobenumfang (n) wurden im Ergebnisteil bzw. in den Abbildungen benannt und Unterschiede mit $p < 0,05$ als signifikant betrachtet.

Alle Tests auf Normalverteilung und Signifikanz wurden mit GraphPad Prism 5.0 durchgeführt. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte ebenfalls mit dieser Software.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Aktivierung humaner Hautmastzellen in der EBA *in vitro*

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle und die Funktion von Mastzellen in der Autoimmunerkrankung EBA geklärt werden. Dem weiteren Vorgehen lag die Hypothese zugrunde, dass Mastzellen in der initialen Entzündungsphase der EBA eine Rolle spielen könnten. In einem ersten Schritt wurde deshalb in einer Reihe von Ansätzen *in vitro* untersucht, ob Mastzellen durch Immunkomplexe und Komplementfaktoren, also Komponenten, die bereits zu Beginn der akuten Entzündungsreaktion der EBA vorkommen, aktiviert werden können.

3.1.1 Humane Hautmastzellen exprimieren CD32 auf ihrer Zelloberfläche

Um zu überprüfen, ob unstimulierte humane Hautmastzellen in der Lage sind, Immunglobulin G (IgG)-Immunkomplexe zu binden, wurde die Expression der Fcγ-Rezeptoren (FcγR) CD16, CD32 und CD64 auf der Zelloberfläche bestimmt. Kultivierte, humane Hautmastzellen wurden 18 Stunden zuvor mit humanem IgE beladen und anschließend zur Bestimmung der Oberflächenmoleküle CD16 (FcγRIII), CD32 (FcγRIIA) und CD64 (FcγRI) mit entsprechenden Antikörpern inkubiert. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich der Fcε-Rezeptor I (FcεRI) über gebundenes IgE auf der Zelloberfläche angefärbt. Die Färbung erfolgte parallel in Mastzell-Isolierungen von zwei gesunden Spendern und die Proben wurden am Durchflusszytometer analysiert.

Die Mastzellen wurden anhand ihrer im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht bestimmten Zellgröße und -granularität identifiziert und ausgewählt (**Abb. 3.1 A**). Die Fluoreszenzintensität (Exzitation 492 nm/Emission 516 nm) dieser Zellpopulation wurde dann im Histogramm aufgetragen. Aus der Fluoreszenzintensität der Einzelereignisse dieser Population wurde der geometrische Mittelwert (geom. MW) berechnet und dieser mit dem Wert der Isotypkontrolle verglichen und somit positive und negative Zellpopulationen unterschieden (**Abb. 3.1 B**).

Dadurch ergab sich für Spender 1, dass 95% der Zellen positiv für FcεRI (geom. MW: 395 vs. 24 (Isotyp)), 98% negativ für CD16 (geom. MW: 21 vs. 16 (Isotyp)), 97% positiv für CD32 (geom. MW: 97 vs. 16) und 82% negativ für CD64 (geom. MW: 14 vs. 16) waren. Für Spender 2 konnten vergleichbare Daten erhoben werden. Während wieder 95% der Zellen FcεRI exprimierten (geom. MW: 821 vs. 41 (Isotyp)), waren 99% CD16-negativ (geom. MW:

10 vs. 12 (Isotyp)), 90% CD32-positiv (geom. MW: 60 vs. 12) und 98% CD64-negativ (geom. MW: 10 vs. 12).

Daraus lässt sich schließen, dass kultivierte humane Hautmastzellen im unstimulierten Zustand als IgG-Rezeptor ausschließlich den aktivierenden, niedrig-affinen FcγRIIA (CD32) auf ihrer Oberfläche exprimieren und damit prinzipiell in der Lage sein könnten, Immunkomplexe bestehend aus Antigen und IgG zu binden

.

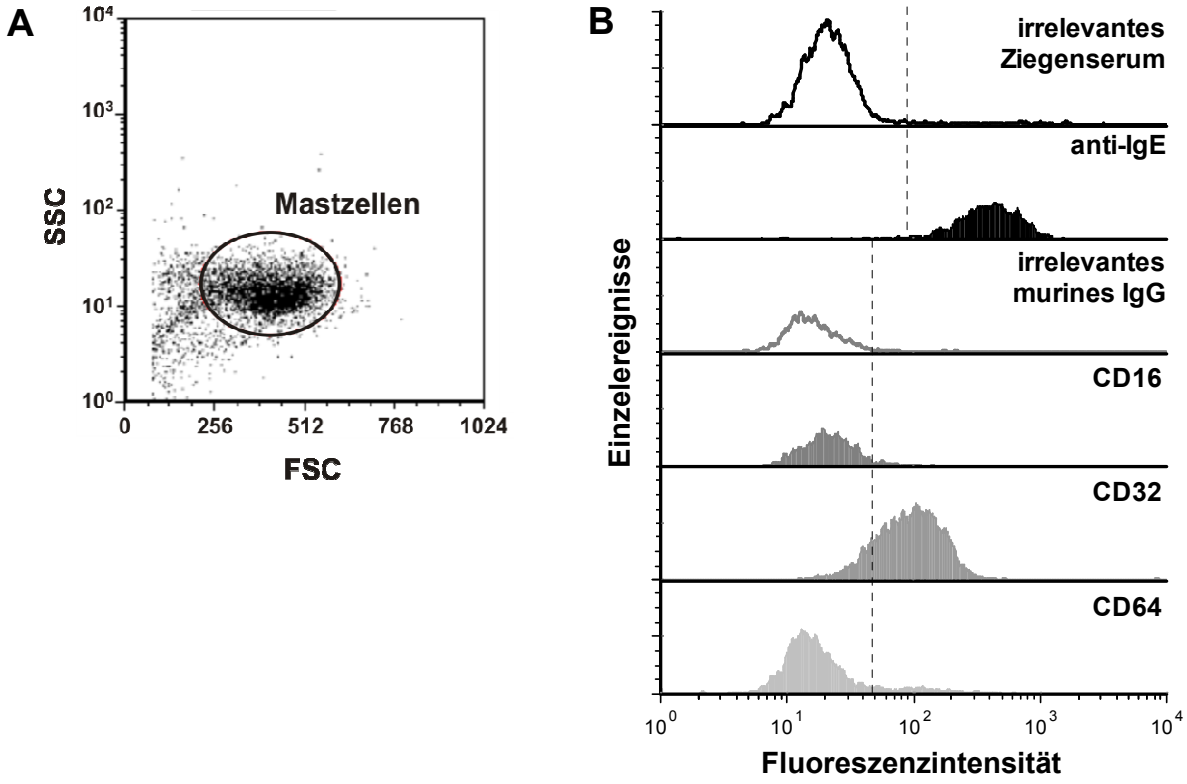


Abb. 3.1: Expression von Fcγ-Rezeptoren auf humanen Hautmastzellen
Humane Hautmastzellen wurden mit humanem IgE beladen und 18 Stunden später auf gebundenes IgE sowie die Expression der Oberflächenrezeptoren CD16 (FcγRIII), CD32 (FcγRIIA) und CD64 (FcγRI) in der Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt sind (**A**) das FSC/SSC-Profil einer repräsentativen Probe und die (**B**) Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Proben mit jeweils 3000 Einzelereignissen als Histogramm. Repräsentativ ist ein Ergebnis von zwei durchgeführten Experimenten mit vergleichbarem Verlauf abgebildet.

3.1.2 Aktivierung von humanen Hautmastzellen durch Immunkomplexe und Komplementfaktoren

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob immobilisierte Immunkomplexe, welche aus murinem Kollagen Typ VII und anti-Kollagen Typ VII-IgG aufgebaut waren, und das Anaphylatoxin C5a eine Degranulation von humanen Hautmastzellen induzieren können. Dazu wurden kultivierte, humane Hautmastzellen mit Medium allein (Negativkontrolle), mit immobilisierten Immunkomplexen (iIC), mit C5a oder mit einer Kombination aus iIC und C5a stimuliert. Als Positivkontrolle diente die Aktivierung durch kreuzvernetzendes anti-IgE. Nach Inkubationszeiten von 30 Minuten, 4 Stunden und 24 Stunden wurden Überstände von allen Ansätzen abgenommen und hinsichtlich ihres Gehaltes an freigesetzter β-Hexosaminidase (30 min) und chemotaktischer Mediatoren (30 min, 4 h, 24 h) weiter untersucht. Darüber hinaus wurde nach vierstündiger Stimulation RNA aus Mastzellen zur Analyse der Genexpression gewonnen.

3.1.2.1 Der Komplementfaktor C5a induziert eine Degranulation in humanen Hautmastzellen

Das Enzym β-Hexosaminidase wird in den Granula von Mastzellen gespeichert und bei einer geeigneten Stimulation in einem als Degranulation bezeichneten Vorgang freigesetzt. Anhand der freigesetzten Menge des Enzyms im Überstand kann auf den Grad der Mastzellaktivierung rückgeschlossen werden.

Die Hautmastzellen zehn verschiedener Spender wurden stimuliert und nach 30 Minuten die Überstände auf die Menge an sezernierter β-Hexosaminidase hin untersucht. Die Mastzellen aller Spender zeigten dabei einander vergleichbare Ergebnisse (**Abb. 3.2**). Mit Medium allein behandelte Mastzellen setzten im Durchschnitt 6,4% ± 6,1 der Gesamt-β-Hexosaminidase frei. Dieser Hintergrund wurde vermutlich durch einen gewissen Anteil sterbender Mastzellen hervorgerufen. Die Überstände iIC-stimulierter Mastzellen unterschieden sich mit 7,6% ± 6,0 nicht signifikant von der Negativkontrolle. Im Gegensatz dazu induzierte die Stimulation mit C5a allein oder in Kombination mit iIC die Freisetzung von durchschnittlich 31,4% ± 18,3 bzw. 29,4% ± 15,0 der β-Hexosaminidase und war damit den Werten der durch anti-IgE stimulierten Positivkontrolle mit 33,9% ± 18,6 vergleichbar. Die Enzymfreisetzung nach Stimulation mit C5a, C5a plus iIC und anti-IgE war dabei gegenüber der Negativkontrolle statistisch signifikant erhöht.

Die Daten zeigen, dass C5a, im Gegensatz zu iIC, eine Degranulation von humanen Hautmastzellen induziert und dass die C5a-vermittelte Freisetzung von β-Hexosaminidase durch iIC nicht moduliert wird.

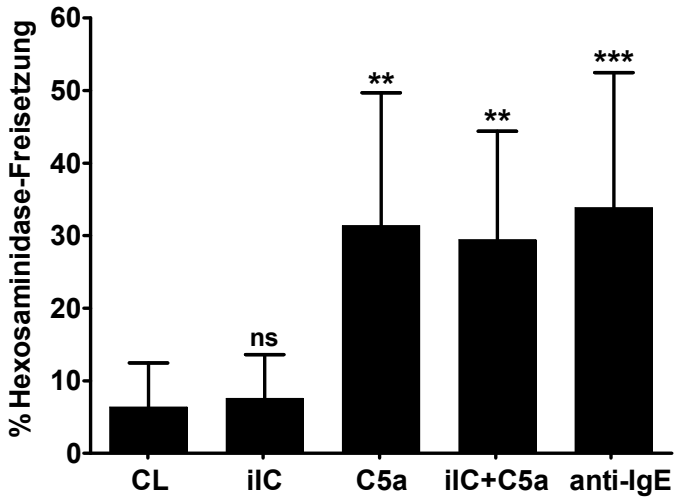


Abb. 3.2: Aktivierung humaner Hautmastzellen
Humane Hautmastzellen wurden mit Medium allein (CL), immobilisierten Immunkomplexen (iIC), 100 nM Anaphylatoxin C5a (C5a), der Kombination aus beiden (iIC+C5a) oder anti-IgE inkubiert. Zellfreie Überstände wurden nach 30 Minuten abgenommen und auf die Freisetzung des Enzyms β-Hexosaminidase durch aktivierte Mastzellen getestet.
Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung zehn unabhängiger Experimente. Die Überprüfung auf signifikante Unterschiede aller Gruppen wurde mithilfe des One-way analysis of variance (ANOVA)-Tests durchgeführt ($p < 0{,}0001$, ***); der Vergleich auf signifikante Unterschiede zwischen stimulierten Ansätzen und der unstimulierten Negativkontrolle erfolgte mittels Bonferroni's Multiple Comparison Test (*, $p < 0{,}05$; **, $p < 0{,}01$; ***, $p < 0{,}001$).

3.1.2.2 C5a- und iIC-stimulierte Hautmastzellen setzen keine für Neutrophile chemotaktischen Mediatoren frei

Nach Aktivierung können Mastzellen verschiedenartige Mediatoren freisetzen, von denen einige, beispielsweise Chemokine, die Rekrutierung weiterer Immunzellen vermitteln können. Zur Bestimmung von auf Neutrophile chemotaktisch wirkende Chemotaxine wurden die Überstände der 30-Minuten-, 4-Stunden- und 24-Stunden-Stimulationsansätze auf ihre Kapazität zur Induktion einer Zellmigration hin untersucht.
Dazu wurden die Überstände der Mastzell-Präparationen verwendet, die im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle nach 30 Minuten eine deutliche Freisetzung der β-Hexosaminidase durch die Stimulation mit C5a bzw. durch die Kreuzvernetzung durch anti-IgE aufwiesen (dargestellt in Abschnitt 3.1.2.1, **Abb. 3.2**).

Eine konzentrationsabhängige Migration der Neutrophilen induzierten nur Überstände von Mastzellen, die mit C5a, C5a und iIC und durch Kreuzvernetzung von gebundenem IgE stimuliert wurden (**Abb. 3.3**). Dabei war die Anzahl gewanderter Neutrophiler auf Überstände der Stimulationsansätze, die mit C5a allein oder in Kombination mit iIC generiert wurden, vergleichbar und lag über den Werten der Positivkontrolle. Währenddessen wanderte nur eine sehr geringe Zahl an Neutrophilen auf die Überstände der unstimulierten („CL“) und der mit iIC inkubierten Mastzellen, was als ungerichtete Migration (=„random migration“) der Neutrophilen betrachtet werden kann.

Nach Auswertung der Einzelergebnisse ließen sich diese bezüglich des Migrationsverhaltens der Neutrophilen auf die Stimulationsansätze „C5a“ und „C5a + iIC“ in drei Gruppen unterteilen. In der ersten Gruppe (n = 4) war eine Chemotaxis der Neutrophilen ausschließlich auf Überstände zu beobachten, die nach 30 Minuten abgenommen waren (**Abb. 3.3 A**), während in der zweiten Gruppe (n = 4) nur die Überstände der vierstündigen Stimulation eine Zellmigration induzierten (**Abb. 3.3 B**). Die Überstände in der dritten Gruppe (n = 2) wiesen keine chemotaktischen Eigenschaften auf (**Abb. 3.3 C**). Nach einer Mastzell-Stimulation von 24 Stunden besaßen nur die Überstände nach Kreuzvernetzung von gebundenem IgE eine chemotaktische Aktivität auf Neutrophile. Die in den C5a-stimulierten Ansätzen nach 30 Minuten und 4 Stunden auftretende chemotaktische Aktivität war nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar. Dies könnte auf eine Instabilität des Mediators beispielsweise gegenüber Proteasen hindeuten.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich zusammenfassen, dass nur Überstände von Mastzellen nach Stimulation mit C5a oder Kreuzvernetzung durch anti-IgE eine chemotaktische Wirkung besitzen.

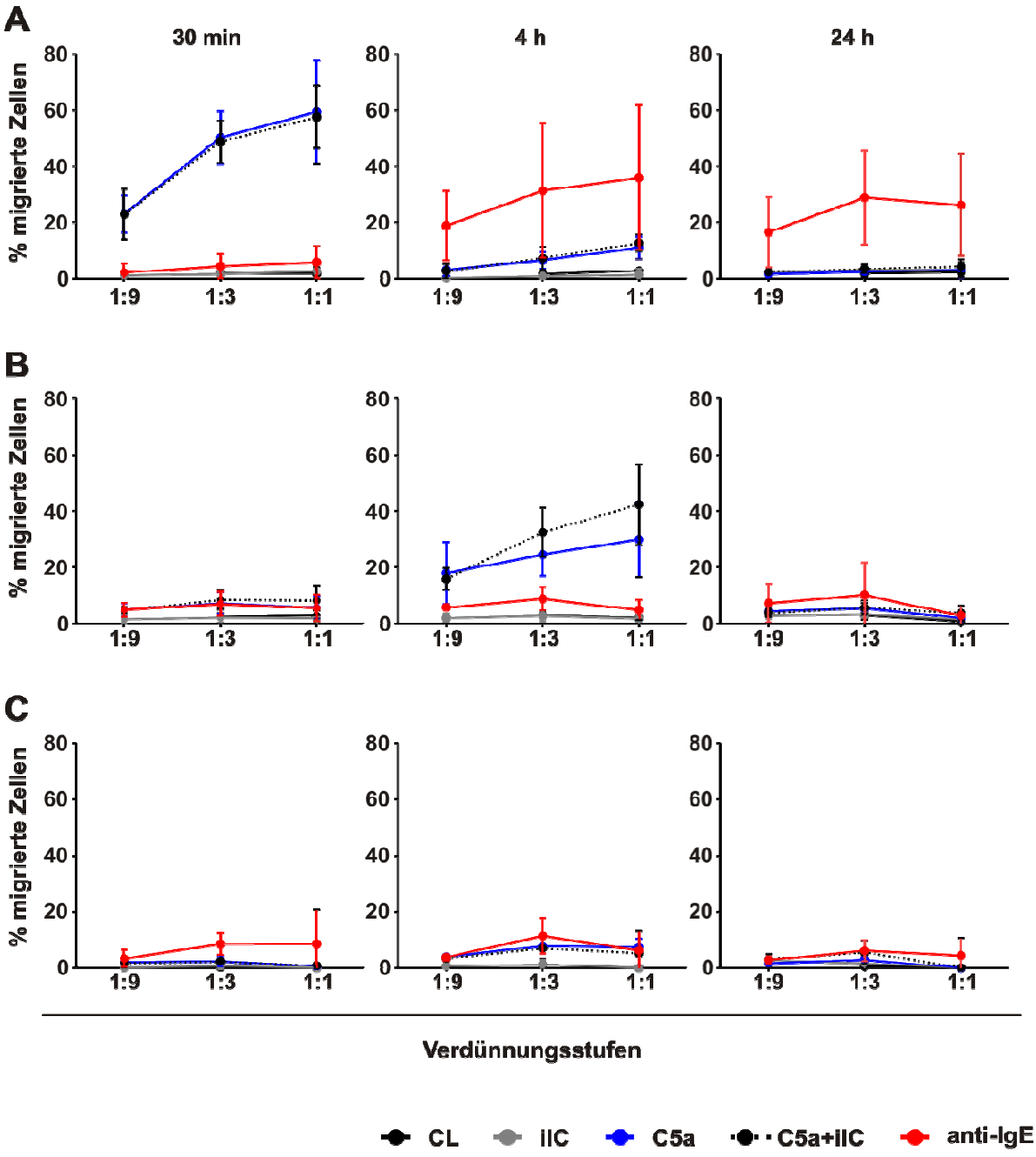


Abb. 3.3: Chemotaxis neutrophiler Granulozyten auf Überstände aktivierter Mastzellen
Die unter Abschnitt 3.1.2 generierten und unter Abb. 3.2 dargestellten Überstände stimulierter Hautmastzellen wurden auf ihre chemotaktische Aktivität gegenüber neutrophilen Granulozyten getestet. Die Einzelergebnisse wurden anhand des Verhaltens der Neutrophilen auf die Mastzell-Überstände der Stimulationsansätze „C5a“ und „C5a + iIC“ unterteilt in Migration auf (**A**) 30-minütige (n = 4) oder (**B**) vierstündige Stimulationsansätze (n = 4) mit C5a oder C5a und Immunkomplexen oder (**C**) in keine Migration (n = 2). Die Daten wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

Da jedoch nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die chemotaktische Aktivität in den durch C5a-Stimulation generierten Überständen auf das bereits zur Aktivierung der Mastzellen eingesetzte C5a zurückzuführen ist, wurde in vier weiteren Experimenten der auf den Neutrophilen exprimierte C5a-Rezeptor (C5aR) mithilfe des C5aR-Antagonisten W-54011 blockiert. Unter Verwendung dieses Inhibitors wurde die chemotaktische Wirkung des nach 4 Stunden gewonnenen Mastzell-Überstandes vollständig aufgehoben, während die entsprechende Lösungsmittel-Kontrolle nur einen geringen Effekt aufwies (**Abb. 3.4**). Da der Antagonist keinen Effekt auf die durch N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-Phenylalanin (fMLP; starker Chemoattraktant für Neutrophile und Positivkontrolle des Chemotaxis-Assays) induzierte Chemotaxis hatte, konnte ein zytotoxischer Effekt des C5aR-Antagonisten ausgeschlossen werden.
Damit lässt sich die chemotaktische Aktivität der in Abb. 3.3 A dargestellten Überstände erklären jedoch nicht das Ausbleiben einer Migration auf die Überstände der 30-Minuten-Stimulation in Abb. 3.3 B. Ein möglicher Grund wäre eine unterschiedliche Konzentration des C5a in den Überständen. Bei sehr hohen Konzentrationen eines Chemotaxins können Zellen keinen Gradienten wahrnehmen und folglich nicht gerichtet wandern sondern werden adhärent. Möglicherweise tritt dieser Fall in Gruppe B ein. Denn ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht darin, dass die Überstände in B nur von halb so hoch konzentrierten Mastzellen generiert wurden wie in Gruppe A und damit vermutlich geringere Werte degradierender Mastzellmediatoren und gleichzeitig höhere Konzentrationen des intakten C5a enthielten. Die daraus resultierende Differenz in der Konzentration des Komplementfaktors könnte ausreichen, um in Gruppe B aufgrund der sehr hohen C5a-Konzentration eine ungerichtete Migration der Neutrophilen zu induzieren während in Gruppe A die C5a-Konzentration innerhalb der ersten 30 Minuten schneller reduziert wurde und somit eine Chemotaxis der Zellen hervorrufen konnte.
Die fehlende chemotaktische Aktivität der Überstände in Gruppe C könnte in einer eingeschränkten biologischen Aktivität der verwendeten Granulozyten begründet sein.

Aus den Daten muss geschlossen werden, dass humane Hautmastzellen nach Stimulation mit C5a allein und in Kombination mit iIC weder kurzfristig noch verzögert für Neutrophile relevante Chemotaxine freisetzen.

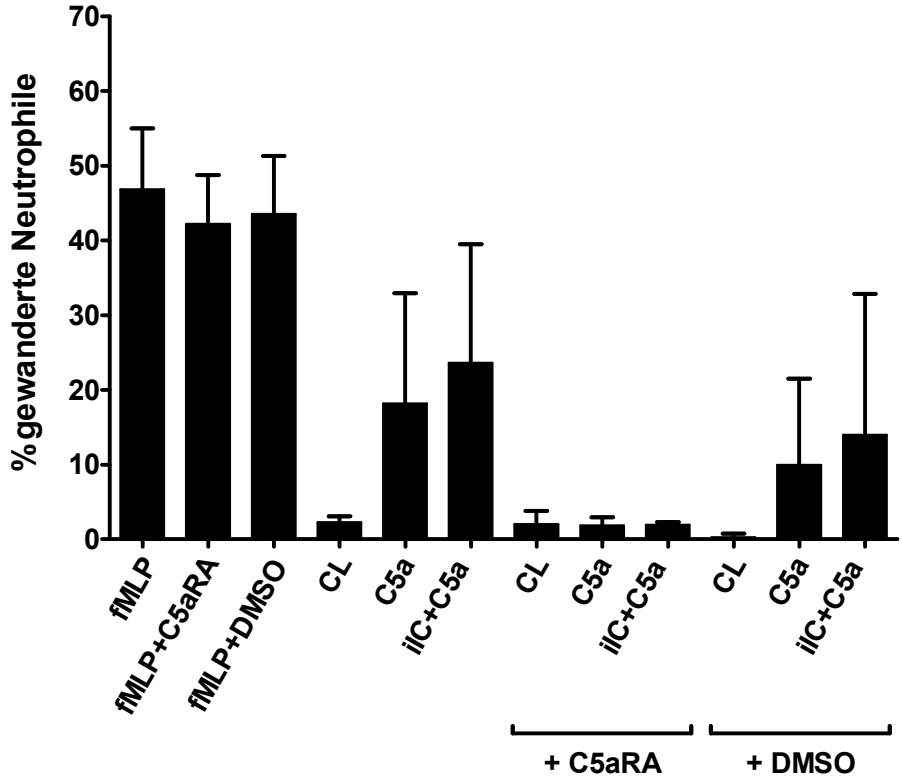


Abb. 3.4: Inhibition der Neutrophilen-Chemotaxis durch Blockade des C5a-Rezeptors
Mastzellen wurden mit dem Komplementfaktor C5a allein oder in Kombination mit immobilisierten Immunkomplexen (iIC) für vier Stunden stimuliert und die chemotaktische Aktivität in den Überständen in An- und Abwesenheit des C5a-Rezeptor-Antagonisten (C5aRA; W-54011) bzw. des verwendeten Lösungsmittels DMSO untersucht. Als Negativkontrolle wurde der Überstand unstimulierter Mastzellen (CL) eingesetzt, während fMLP, ein starker Chemoattraktant für Neutrophile, als Positivkontrolle mitgeführt wurde. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.1.2.3 Effekt von C5a und iIC auf die Genexpression in humanen Hautmastzellen

Mastzellen nehmen an entzündlichen Prozessen nicht nur über die Freisetzung von Mediatoren sondern auch über die Regulation anderer Proteine wie beispielsweise verschiedener Rezeptoren teil. Um einen solchen Prozess umfassend abbilden zu können, wurden kultivierte, humane Hautmastzellen mit Medium allein (Negativkontrolle), mit iIC, mit C5a, mit einer Kombination aus iIC und C5a oder mit anti-IgE für vier Stunden inkubiert, ihre Gesamt-RNA von allen fünf Stimulationsansätzen isoliert und diese mithilfe von Microarrays auf Veränderungen im Genexpressionsmuster des gesamten Genoms untersucht. Verwendet wurden Mastzell-Präparationen von drei gesunden Spendern, die im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle eine deutliche Freisetzung der β-Hexosaminidase durch die Stimulation mit C5a bzw. durch die Kreuzvernetzung durch anti-IgE aufwiesen.

Um zu wissen, ob die isolierte RNA qualitativ und quantitativ den Anforderungen der Microarray-Analyse genügte, wurde zunächst die Quantität am Spektrophotometer bestimmt und die RNA-Qualität mithilfe des Bioanalyzers untersucht. Bei letzterer Methode wird die RNA auf ein Mikro-Gel aufgetragen und elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt, wodurch eine 18S-, eine 28S-Bande und Degradationsprodukte sichtbar werden. Basierend auf einem Algorithmus, der die gesamte elektrophoretische Spur der RNA-Probe analysiert und dabei die An- und Abwesenheit von degradierten Produkten berücksichtigt, kann die Qualität der RNA in der sogenannten RNA Integrity Number (RIN) zusammengefasst werden. Eine RIN von 10 bedeutet eine vollständig intakte RNA, während Werte zwischen 5 und 1 auf eine teilweise bis sehr starke RNA-Degradation hindeuten. Für Microarray-Analysen sollte die RNA keine schlechtere Qualität als RIN = 8 aufweisen.
Von allen 15 Proben stand ausreichend RNA für die Microchip-Analyse zur Verfügung. In neun von 15 Proben lag der RIN-Wert bei ≥ 8,2, sodass diese Proben für die Microarray-Studie geeignet waren. Für die restlichen sechs Proben war die RNA-Konzentration vermutlich zu gering für eine RIN-Berechnung. Da das Gel jedoch zwei deutliche, scharfe Banden für die 18S- und 28S-rRNA und keine Degradationsprodukte aufwies (Daten nicht gezeigt), wurden diese Proben in die Studie mit eingeschlossen.

Das so gewonnene Probenmaterial wurde vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München mittels Affymetrix DNA-Microarray-Chips analysiert.
Die mit diesem Verfahren generierten Daten wurden mithilfe der Affymetrix-Software normalisiert, in die Software DChip importiert und die so erhaltenen Genexpressionsmuster der stimulierten Ansätze mit dem des unstimulierten Ansatzes verglichen. Gene, deren Expressionswerte sich in den zu vergleichenden Ansätzen mindestens um den Faktor zwei unterschieden, also zweifach erhöht oder um die Hälfte reduziert waren, und eine absolute Differenz von mindestens 100 aufwiesen, wurden als relevant definiert und in einer Liste zusammengetragen.
Die Aktivierung der Mastzellen mit den verschiedenen Stimuli führte zu einer Regulation einer großen Zahl unterschiedlicher Gene. Jedoch fanden sich beim Vergleich der Expressionsmuster der Negativkontrolle mit denen der drei zu untersuchenden Ansätze („iIC“, „C5a“ und „C5a + iIC“) keine Unterschiede, die die oben genannten Kriterien erfüllten. Lediglich der Vergleich der unstimulierten mit denen durch Kreuzvernetzung mit anti-IgE-stimulierten Mastzellen identifizierte nach unseren Bedingungen 68 verändert regulierte Gene (Anhang, **Tab. A.1**). Diese waren hauptsächlich stärker transkribiert als in unstimulierten Zellen und konnten Transkriptions- und Zellregulationsprozessen (u.a. Signaltransduktion, Zellproliferation) oder immunregulatorischen Prozessen zugeordnet

werden. Die Genexpression nach Mastzell-Stimulation mit anti-IgE ist jedoch nicht Fokus dieser Arbeit, sondern wurde lediglich als Positivkontrolle mitgeführt. Deshalb und da dieser Effekt bereits in anderen Studien ausführlich untersucht wurde[143–146], soll auf dieses Genexpressionsmuster nicht weiter eingegangen werden.

Als Resultat der Genexpressionsananalyse mithilfe der Microarray-Technologie ergibt sich, dass die Stimulation von humanen Hautmastzellen mit Immunkomplexen, C5a oder der Kombination aus beiden im Vergleich zu unstimulierten Zellen nach unseren Kriterien keine wesentlichen Veränderungen im Genexpressionsmuster dieser Zellen hervorruft.

3.2. Experimentelle EBA in Mastzell-defizienten Mäusen

Aus den *in vitro* durchgeführten Ansätzen geht hervor, dass sich Mastzellen zumindest durch eine während des Entzündungsprozesses entstehende Komponente, dem C5a, aktivieren lassen. Aus diesen Experimenten kann jedoch weder geschlossen werden, ob diese Aktivierung tatsächlich von Relevanz für die Pathogenese der Erkrankung ist, noch ob dies den einzigen über Mastzellen vermittelten Pathomechanismus darstellt. Denn obwohl Versuche, die *in vitro* durchgeführt werden, sich hervorragend für die Untersuchung von einzelnen Zellen und ihren Funktionen eignen, berücksichtigen sie nicht die physiologische Umgebung dieser Zellen *in vivo*. Die in ihrer Nachbarschaft vorkommenden Strukturen und Zelltypen sowie verschiedene Mediatoren können einen relevanten Einfluss beispielsweise auf das Expressionsmuster bestimmter Rezeptoren und damit auf die Funktionalität der Zellen nehmen. Konsequenterweise wurde in den nun folgenden Abschnitten die funktionelle Rolle von Mastzellen in der EBA in verschiedenen Tiermodellen *in vivo* untersucht.

3.2.1 Experimentelle EBA in Mauslinien mit konstitutiver Mastzelldefizienz

Um die prinzipielle Rolle von Mastzellen in der experimentellen EBA zu untersuchen, wurden zunächst zwei Mausstämme mit einer konstitutiven Defizienz in Mastzellen im passiven systemischen Modell der EBA verwendet: C57BL/6J-Kit$^{W\text{-}sh/W\text{-}sh}$ (W-sh) und WBB6F1-Kit$^{W/W\text{-}v}$ (W/W-v), welche mit ihren entsprechenden Wildtypen (C57BL/6J-Kit$^{+/+}$ und WBB6F1-Kit$^{+/+}$) verglichen wurden. Nach wiederholter Gabe von pathogenem Kaninchen anti-murinen Kollagen VII-IgG (amCOL7) oder IgG aus nicht immunisierten Kaninchen (Isotyp) wurden alle Mäuse an den Tagen 4, 8, 12 und 16 auf EBA-typische Hautläsionen (Haarausfall, Rötung, Blasen- und Schorfbildung) untersucht und der Anteil der erkrankten Haut im Verhältnis zur Körperoberfläche bestimmt.

Beide Stämme entwickelten den typischen Phänotyp der EBA innerhalb von vier Tagen nach der ersten pathogenen Antikörper-Injektion (**Abb. 3.5** und **3.6**). Dabei waren, entgegen meiner Annahme, die Mastzell-defizienten Linien nicht vor der Erkrankung geschützt, sondern zeigten ebenfalls deutliche Hautläsionen. Beide Mausstämme unterschieden sich jedoch deutlich in Verlauf und Schweregrad der EBA. Überraschenderweise entwickelten Mäuse des W-sh-Stammes die Erkrankung mit einer signifikant schwereren klinischen Symptomatik als die korrespondierenden Wildtyp-Kontrollen (**Abb. 3.5**). Diese manifestierte sich bereits an Tag 4 ($p = 0{,}0355$, *) und stieg in den nachfolgenden 12 Tagen weiter an (Tag 8: $p = 0{,}0004$, ***; Tag 12: $p = 0{,}0004$, ***; Tag 16: $p = 0{,}0030$, **; **Abb. 3.5 A**). Über den gesamten Beobachtungszeitraum berechnet, waren die Mastzell-defizienten Tiere signifikant stärker von der EBA betroffen als die Tiere der mitgeführten Wildtyp-Kontrolle, welche ebenfalls den pathogenen Antikörper erhalten hatten (AUC: $p < 0{,}0001$, ***; **Abb. 3.5 B**).

Diese Diskrepanz ließ sich jedoch im zweiten verwendeten Mausstamm nicht reproduzieren (**Abb. 3.6**). Während des gesamten Krankheitsverlaufs entwickelten Tiere des W/W-v-Stammes eine den Mastzell-kompetenten Wurfgeschwistern vergleichbare Symptomatik, die sich weder an einzelnen Versuchstagen (**Abb. 3.6 A**) noch im Gesamtverlauf (**Abb. 3.6 B**) signifikant voneinander unterschied. In allen verwendeten Mauslinien entwickelten Tiere, die mit dem Isotyp behandelt wurden, keine pathologischen Veränderungen der Haut (**Abb. 3.5** und **3.6**).

Interessanterweise wies die Verteilung der Hautläsionen über den Körper zwischen beiden Stämmen Unterschiede auf (**Abb. 3.5 D** und **3.6 D**). Während Füße und Kopf immer betroffen waren und Ohren und Schwanz nur einen geringen bis überhaupt keinen Befall zeigten, unterschieden sich beide Mausstämme am Rumpf. Hier entwickelten ausschließlich die Mäuse der W-sh-Linie und ihre Wildtyp-Kontrollen eine ausgeprägte Pathologie.

Zusätzlich unterschieden sich die Mastzell-defizienten Tiere von ihren Wildtyp-Kontrollen in einzelnen Körperregionen in der Stärke des Befalls. Während die Tiere des W-sh-Stammes an Rumpf und Füßen einen signifikant stärkeren Phänotyp entwickelten als die entsprechenden Mastzell-kompetenten Mäuse (**Abb. 3.5 D**), manifestierte sich an den Ohren der W/W-v-Tiere eine stärkere und an Füßen und Schwanz eine mildere Symptomatik der Erkrankung im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen (**Abb. 3.6 D**).

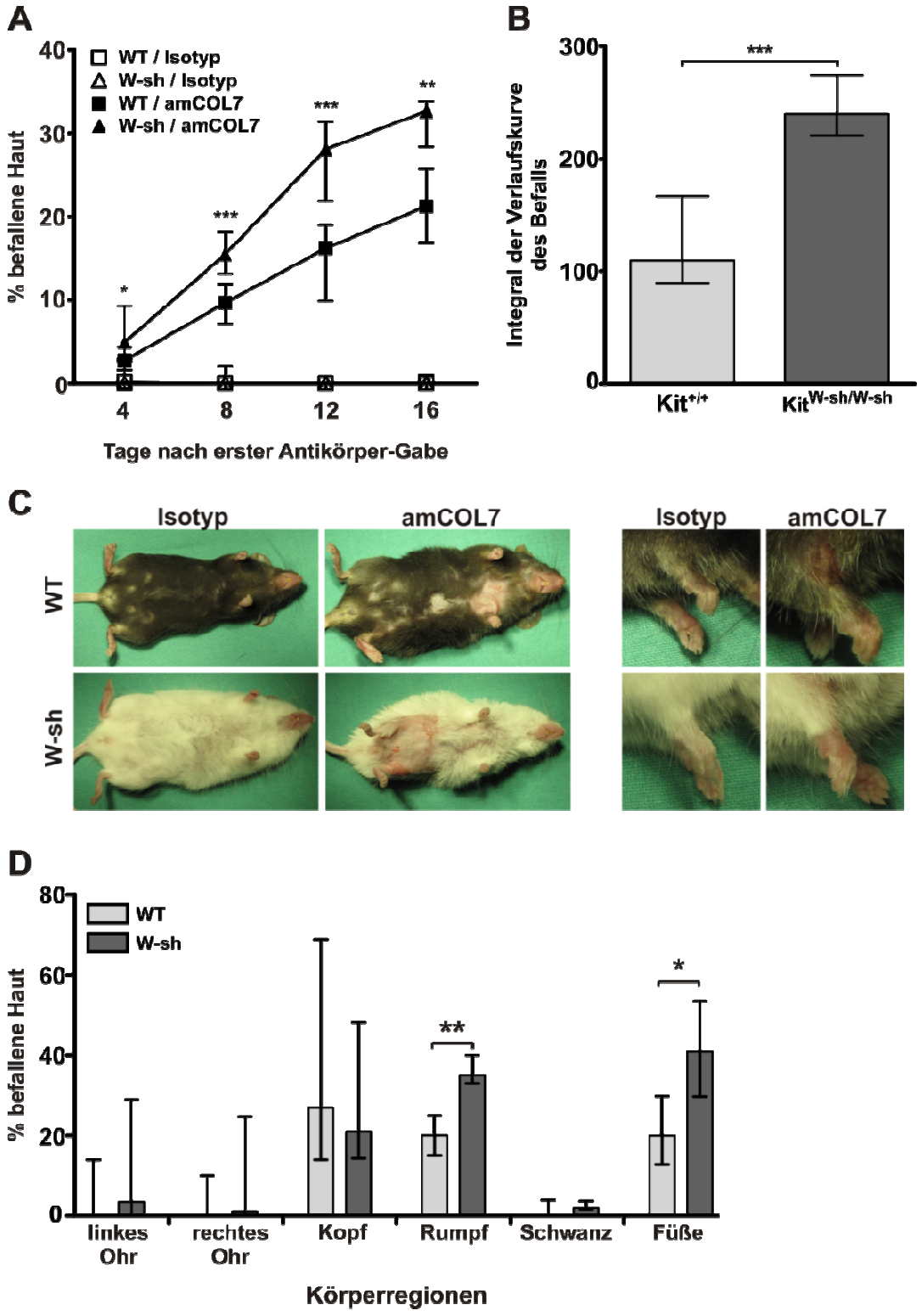


Abb. 3.5: Experimentelle EBA in konstitutiv Mastzell-defizienten W-sh-Mäusen

Der Legendentext befindet sich auf der nachfolgenden Seite.

Abb. 3.5: Experimentelle EBA in konstitutiv Mastzell-defizienten W-sh-Mäusen
W-sh-Mäuse oder Wildtypen erhielten pathogenes Kaninchen anti-murines Kollagen VII-IgG (amCOL7) oder irrelevantes Kaninchen-IgG desselben Isotyps (Isotyp) an Tag 0, 2, 4, 6, 8 und 10 und wurden an Tag 4, 8, 12 und 16 auf klinische Symptome (Hautläsionen) untersucht. (**A**) Der prozentuale Befall der Körperoberfläche wurde als Verlaufskurve über den gesamten Beobachtungszeitraum dargestellt. (**B**) Zusätzlich wurde das Integral der Verlaufskurven der mit amCOL7-behandelten Tiere berechnet. (**C**) Am Abschlusstag des Experiments (Tag 16) wurde der Phänotyp der Mäuse fotographisch dokumentiert und repräsentative Bilder jeder Gruppe abgebildet sowie (**D**) der Befall einzelner Körperregionen an Tag 16 zwischen beiden Gruppen verglichen.
Dargestellt sind die Mediane mit Interquartilsabstand von zwei unabhängigen Experimenten jeweils durchgeführt mit drei (Isotyp) und sechs (amCOL7) Mäusen pro experimenteller Gruppe (A, B, D). Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und W-sh-Tieren in den amCOL7-behandelten Gruppen wurden für jeden Zeitpunkt mithilfe des Mann-Whitney Tests ermittelt und als Stern dargestellt (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Die unter Verwendung der beiden konstitutiv Mastzell-defizienten Mausstämme generierten Daten lassen keinen eindeutigen Schluss bezüglich der Rolle von Mastzellen in der EBA zu. Entgegen der ursprünglichen Arbeitshypothese, nach der Mastzellen eine pro-pathogene Funktion in der Pathogenese der EBA haben sollten, waren beide Mastzell-defizienten Mausstämme anfällig gegenüber der Erkrankung. Während die Befunde aus den Ansätzen mit der W-sh-Linie jedoch für eine protektive, der Krankheitsentstehung entgegengesetzte Rolle dieser Zellen in der EBA sprechen, lassen die Ergebnisse aus den mit W/W-v-Mäusen durchgeführten Versuchen keine solche Schlussfolgerung zu.

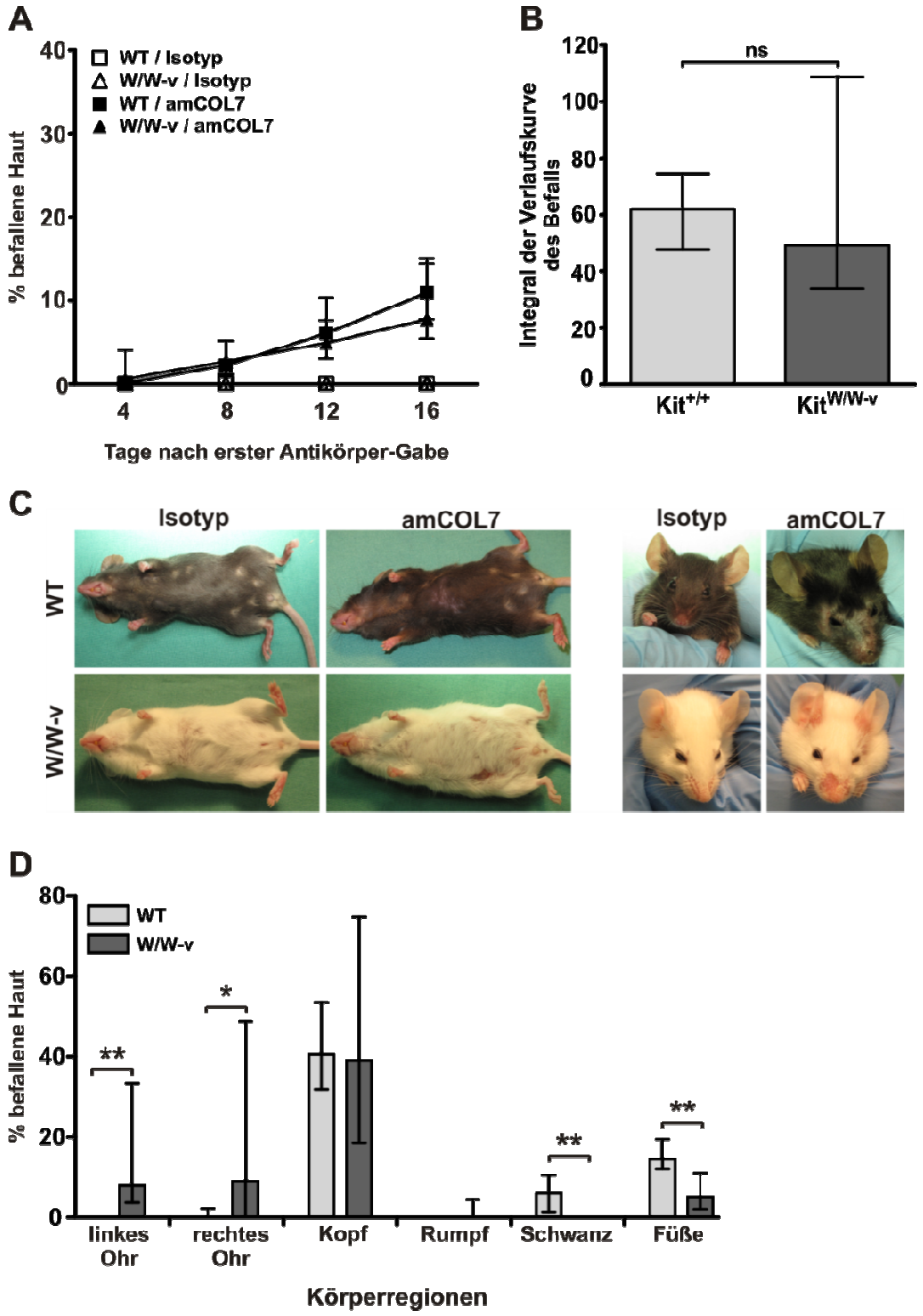


Abb. 3.6: Experimentelle EBA in konstitutiv Mastzell-defizienten W/W-v-Mäusen

Zur Induktion einer EBA erhielten W/W-v-Tiere oder Wildtypen an Tag 0, 2, 4, 6, 8 und 10 pathogenes Kaninchen anti-murines Kollagen VII-IgG (amCOL7) oder irrelevantes Kaninchen-IgG desselben Isotyps (Isotyp) und wurden an Tag 4, 8, 12 und 16 auf klinische Symptome (Hautläsionen) untersucht. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte wie in der Legende zu Abb. 3.5 beschrieben.

3.2.2 Experimentelle EBA in Mäusen mit konditionaler Mastzelldefizienz

Die Mastzelldefizienz der W-sh- und W/W-v-Linien beruht auf Mutationen im *c-Kit*-Gen. Da Kit, der Rezeptor für den Wachstumsfaktor SCF, auch an der Entwicklung und Ausdifferenzierung anderer hämatopoetischer Zellen wie beispielsweise von Neutrophilen beteiligt ist, weisen diese Mausstämme neben der Mastzelldefizienz auch in anderen Zelltypen einen besonderen Phänotyp auf. Da diese Nebeneffekte ebenfalls Einfluss auf die Ausprägung der EBA haben und damit für die diskrepanten Befunde zwischen dem W-sh- und dem W/W-v-Stamm verantwortlich sein könnten, wurde ein dritter Mastzell-defizienter Mausstamm untersucht, dessen Mastzelldefizienz unabhängig von Mutationen im *c-Kit*-Gen ist. Der kürzlich hergestellte und in Abschnitt 1.3.4 beschriebene doppelt transgene *Mcpt5-Cre iDTR*-Mausstamm (Cre/iDTR)[118,119] exprimiert den menschlichen Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) auf der Oberfläche von Bindegewebs-Mastzellen, also Mastzellen der Haut. Durch Applikation geringer Dosen von Diphtherietoxin (DT) können diese Zellen spezifisch und im normal entwickelten, adulten Tier depletiert werden.

Um Bindegewebs-Mastzellen abzureichern, wurden Cre/iDTR-Mäuse viermal im wöchentlichen Intervall mit DT vorbehandelt, während Mastzell-kompetente Kontrollen entsprechende Mengen PBS erhielten. Zur Überprüfung der Mastzelldepletion wurde die Anzahl der Mastzellen pro mm^2 Haut in mit Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase-gefärbten Gewebeschnitten bestimmt. Dabei wurden fünf verschiedene Hautregionen (Schnauze, Ohren, Bauch, Füße und Schwanz) auf ihre Mastzelldichte untersucht. Es zeigte sich, dass die Depletion in den verschiedenen Regionen mit unterschiedlicher Effizienz verlief und die Depletionsrate eine Spanne von 76% im Ohr bis 90% im Schwanz aufwies (Schnauze: 86%, Füße: 79%, Bauch: 88%). Im Durchschnitt zeigten die DT-behandelten Mäuse verglichen mit den PBS-behandelten Tieren einen Verlust von etwa 84% der Bindegewebs-Mastzellen (47 ± 2,73 vs. 7 ± 5,12 Mastzellen/mm^2; MW ± SD) (**Abb. 3.7**).

DT- und PBS-behandelten Mäusen wurde nachfolgend der pathogene amCOL7-Antikörper oder irrelevantes Kaninchen-IgG injiziert, wie bereits für die konstitutiv Mastzell-defizienten Stämme beschrieben (Abschnitt 3.2.1). Sowohl die Mastzell-kompetenten als auch die Mastzell-defizienten Tiere bildeten Hautläsionen aus, die an Tag 16 nach der ersten Antikörpergabe ungefähr 15% (Mastzell-kompetente Gruppe) bzw. 11% (Mastzell-defiziente Gruppe) der gesamten Körperoberfläche einnahmen (**Abb. 3.8 A und C**). Über den gesamten Zeitraum berechnet, zeigten die Mastzell-defizienten Tiere zwar eine leicht, jedoch nicht signifikant mildere Symptomatik der EBA als die entsprechenden Wildtyp-Kontrollen (AUC: $p = 0{,}3744$; **Abb. 3.8 B**). Der Befall verteilte sich in beiden Gruppen hauptsächlich auf Kopf, Füße und Schwanz, während der Rumpf nahezu keine Hautläsionen aufwies. Zudem

waren die Mastzell-kompetenten Mäuse im Vergleich zu den Mastzell-defizienten Tieren tendenziell stärker an Ohren, Füßen und Kopf sowie signifikant am Schwanz betroffen (**Abb. 3.8 D**).

Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse aus den Experimenten mit dem W/W-v-Stamm und erlauben die Schlussfolgerung, dass Mastzellen, entgegen meiner ursprünglichen Hypothese, zumindest an der Ausbildung der klinischen Symptomatik der EBA nicht beteiligt sind.

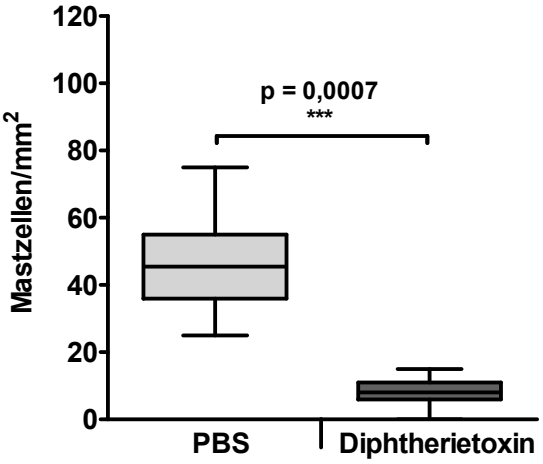


Abb. 3.7: Depletion der Bindegewebs-Mastzellen in Cre/iDTR-Mäusen
Doppelt transgene Cre/iDTR-Mäuse wurden im wöchentlichen Intervall entweder mit Diphtherietoxin (4x25 ng/g KG (i.p.)) oder dem gleichen Volumen PBS behandelt. Am Ende des Experiments wurden die Tiere getötet und die Mastzellzahl/mm^2 in Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase-gefärbten Gewebeschnitten der Haut von verschiedenen Körperregionen mikroskopisch bestimmt. Ausgezählt wurden drei Schnitte pro Hautregion und fünf Hautregionen (Schnauze, Ohr, Bauch, Fuß, Schwanz) pro Maus, die für jedes Tier gemittelt wurden. Die Daten beider Gruppen (PBS: n = 18; DT: n = 11) wurden hier als Boxplots mit Antennen (nach Tukey) dargestellt und signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen mittels Mann-Whitney Tests bestimmt (***, $p < 0,001$).

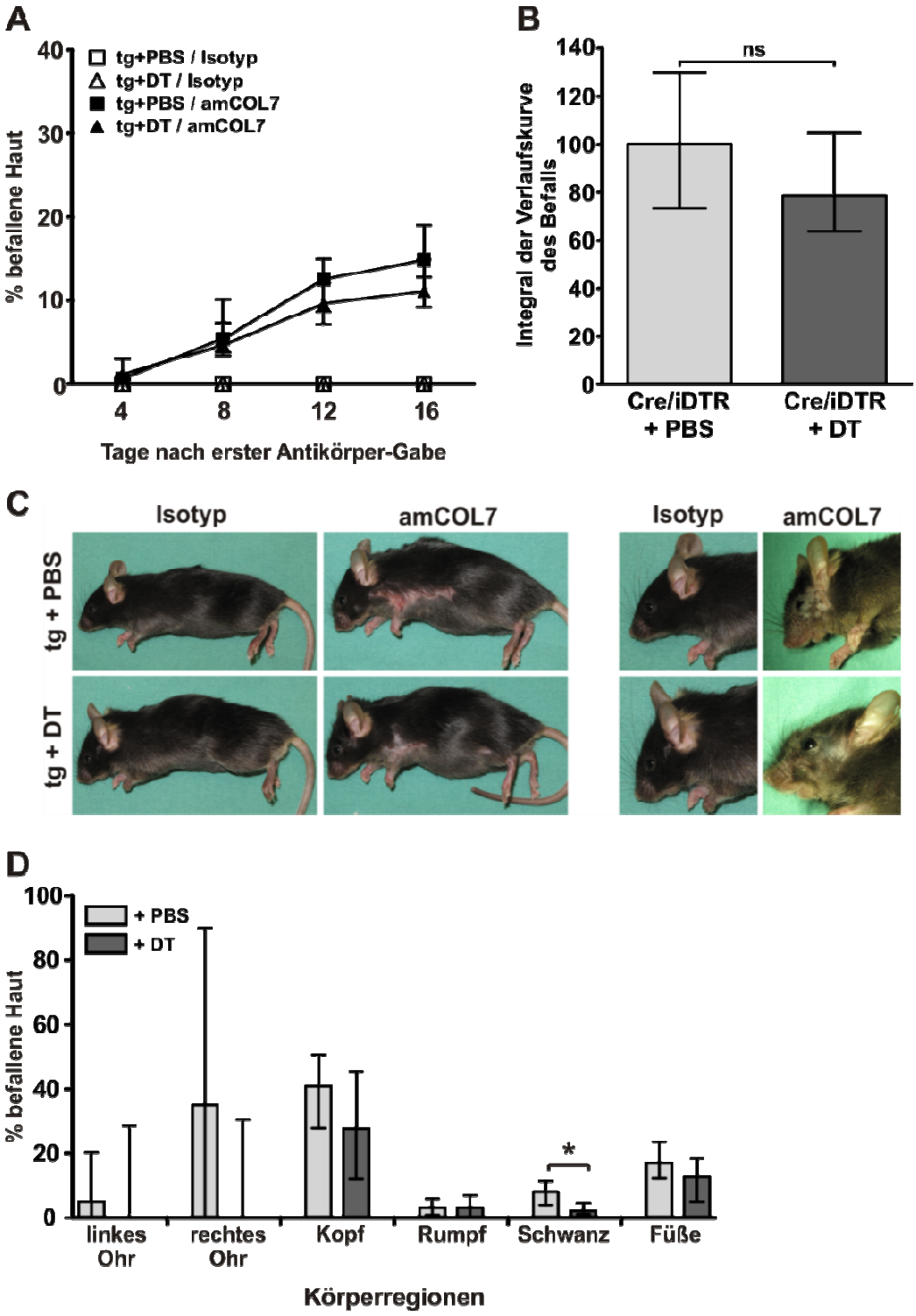


Abb. 3.8: Experimentelle EBA in PBS- und DT-behandelten Cre/iDTR-Mäusen

Zur Depletion der Mastzellen wurden doppelt transgene Cre/iDTR-Mäuse mit Diphtherietoxin (Cre/iDTR+DT) viermal im wöchentlichen Intervall mit 25 ng/g KG (i.p.) behandelt während Kontroll-Tiere ein äquivalentes Volumen an PBS erhielten (Cre/iDTR+PBS). Anschließend bekamen alle Mäuse pathogenes Kaninchen anti-murines Kollagen VII-IgG (amCOL7) oder irrelevantes Kaninchen-IgG desselben Isotyps (Isotyp) an Tag 0, 2, 4, 6, 8 und 10 und wurden an Tag 4, 8, 12 und 16 auf klinische Symptome untersucht. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte wie in der Legende zu Abb. 3.5 beschrieben.

3.2.3 Suszeptibilität der drei Mausstämme gegenüber dem pathogenen Antikörper im Vergleich

Obwohl in allen drei untersuchten Mausstämmen identische Antikörper-Präparationen verwendet und exakt gleiche Mengen des pathogenen amCOL7-IgGs den Mäusen appliziert wurden, prägten die verschiedenen Stämme die klinischen Symptome der EBA unterschiedlich stark aus (Kruskal-Wallis Test: $p < 0{,}0001$, ***; **Abb. 3.9**). Mäuse des W-sh-Stammes entwickelten die Erkrankung signifikant stärker als die beiden anderen Mauslinien, was durch das Integral der Verlaufskurven der EBA verdeutlicht wird (Dunn's Multiple Comparison Test: W-sh vs. W/W-v: $p < 0{,}0001$, ***; W-sh vs. Cre/iDTR $p < 0{,}01$, **). Im Gegensatz dazu wichen die W/W-v- und Cre/iDTR-Mäuse im Ausmaß ihres Befalls nicht signifikant voneinander ab (W/W-v vs. Cre/iDTR $p > 0{,}05$, ns).

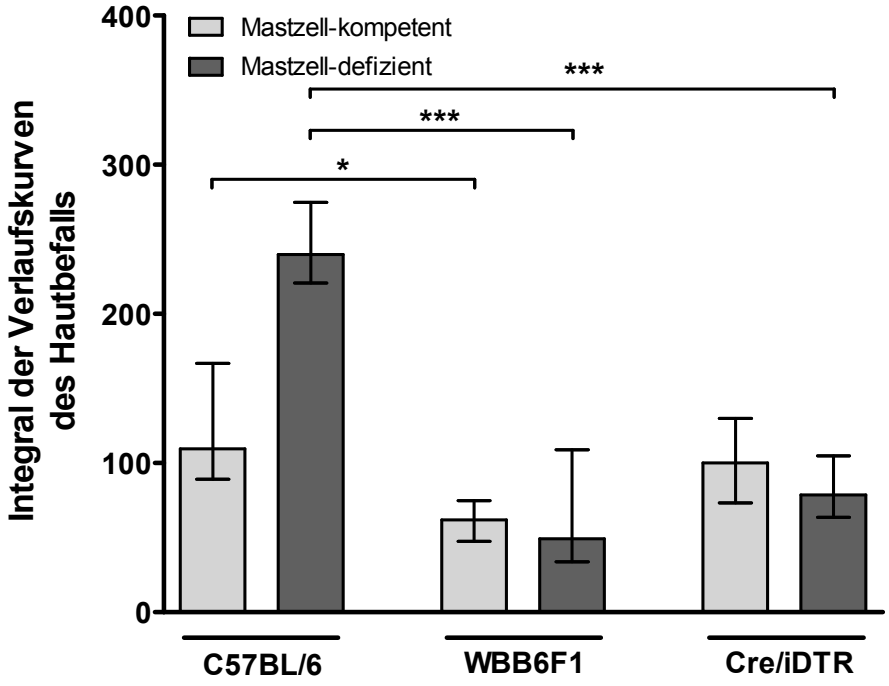


Abb. 3.9: Vergleich des klinischen Schweregrades der Mastzell-defizienten Stämme
Vergleichende Darstellung der Integrale des prozentualen Befalls über die Versuchszeit für die verwendeten Mausstämme unter Behandlung mit amCOL7-Antikörpern. Die Daten entstammen den in Abb. 3.5, 3.6 und 3.8 dargestellten Versuchen.
Dargestellt sind die Mediane mit Interquartilsabstand. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Kruskal-Wallis Tests ($p < 0{,}0001$; ***) und der Vergleich der Mastzell-kompetenten bzw. -defizienten Gruppen unterschiedlicher Stämme einzeln miteinander mittels Dunn's Multiple Comparison Tests (*, $p < 0{,}05$; ***, $p < 0{,}001$).

3.2.4 Histologische Analyse der experimentellen EBA in Mastzell-defizienten Mäusen

Im Verlauf der Entzündungsreaktion der EBA kommt es zu einer Ablagerung von Antikörpern und Komplementfaktoren in der Haut und nachfolgender Infiltration von Entzündungszellen in das erkrankte Gewebe. Diese Veränderungen lassen sich in Gewebeschnitten histologisch nachweisen. Obwohl die klinische Untersuchung auf makroskopischer Ebene der verschiedenen Mastzell-defizienten Mausstämme gegen eine relevante Rolle von Mastzellen in der experimentellen EBA sprach, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass das Entzündungsbild im Gewebe Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen aufweist. Weiterhin sollte geprüft werden, ob sich der im Vergleich zum Wildtyp und zu den anderen Mastzell-defizienten Linien höhere Befall im W-sh-Stamm auf histologischer Ebene erklären ließ.

In den unter 3.2.1 und 3.2.2 beschriebenen Experimenten wurden den Mäusen daher an Tag 16 Hautproben für Paraffin- und Gefrierschnitte entnommen. Mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung wurde die Ablagerung des im Experiment injizierten amCOL7-IgG sowie die Deposition des Komplementfaktors C3 nachgewiesen. Entsprechende Kontrollen der Fluoreszenzfärbung, d.h. Negativkontrolle (ungefärbt), Isotypkontrolle (Ersatz des Primärantikörpers durch IgG desselben Isotyps) und Sekundärantikörper-Kontrolle (Färbung ohne Primärantikörper), wurden mitgeführt und zeigten kein Fluoreszenzsignal (Daten nicht dargestellt). In allen drei untersuchten Mausstämmen und ihren Wildtyp-Kontrollen konnte die Bindung des amCOL7-IgG sowie des Komplementfaktors C3 in allen gesammelten Hautproben nachgewiesen werden (**Abb. 3.10 bis 3.12**). Beide Proteine befanden sich in direkter räumlicher Nähe zueinander in der DEJ. Wie erwartet ließen sich in Proben von Mäusen, die mit der Isotypkontrolle behandelt wurden, weder Ablagerungen von Kaninchen-IgG noch vom Komplementfaktor C3 detektieren (**Abb.3.10 bis 3.12**).

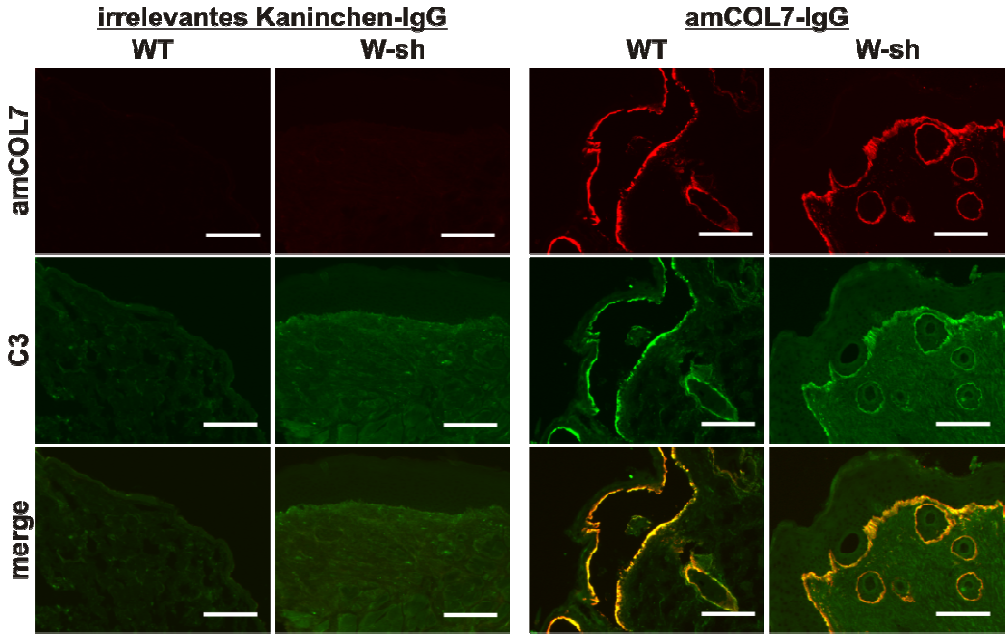


Abb. 3.10: Ablagerung von Kaninchen-IgG und des Komplementfaktors C3 in W-sh-Tieren
Dargestellt sind Gefrierschnitte von Hautproben von W-sh-Mäusen und den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen aus dem unter 3.2.1 beschriebenen Experiment. Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurde in diesen Schnitten die Ablagerung von Kaninchen-IgG (obere Reihe) und des Komplementfaktors C3 (mittlere Reihe) sowie deren räumliche Nähe zueinander (untere Reihe) an der DEJ im Fluoreszenzmikroskop detektiert. Hautproben der mit anti-murinem Kollagen VII-IgG behandelten Mäuse sind rechts (dritte und vierte Spalte), der mit irrelevantem Kaninchen-IgG desselben Isotyps behandelten Tiere links (erste und zweite Spalte) dargestellt. (Maßstab = 100 µm)

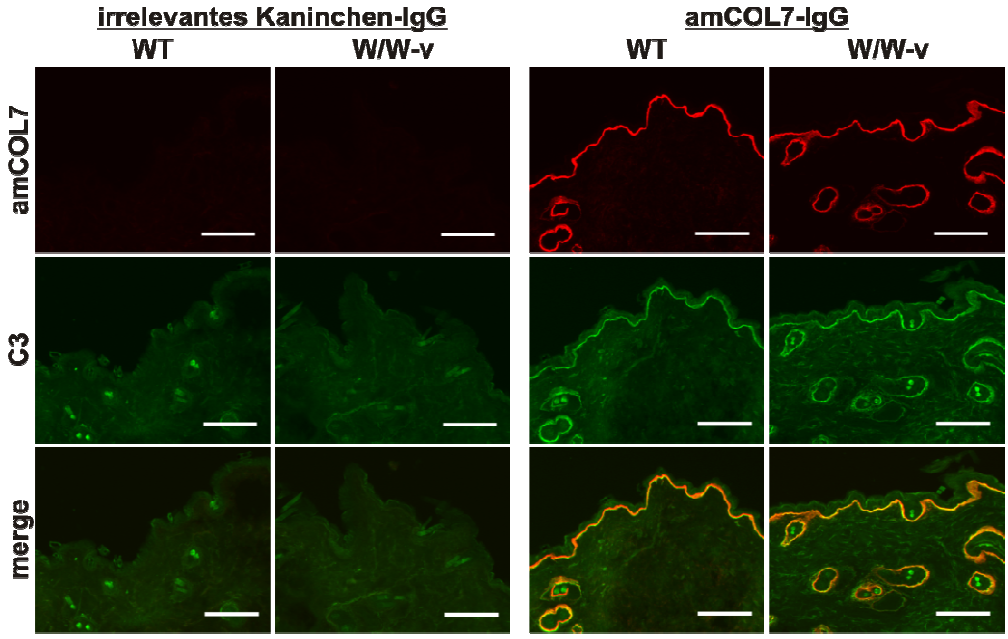


Abb. 3.11: Ablagerung von Kaninchen-IgG und des Komplementfaktors C3 in W/W-v-Mäusen
Dargestellt sind Gefrierschnitte von Hautproben von W/W-v-Mäusen und ihren Wildtyp-Kontrollen aus dem unter 3.2.1 beschriebenen Experiment. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte wie in der Legende zu Abb. 3.10 beschrieben.

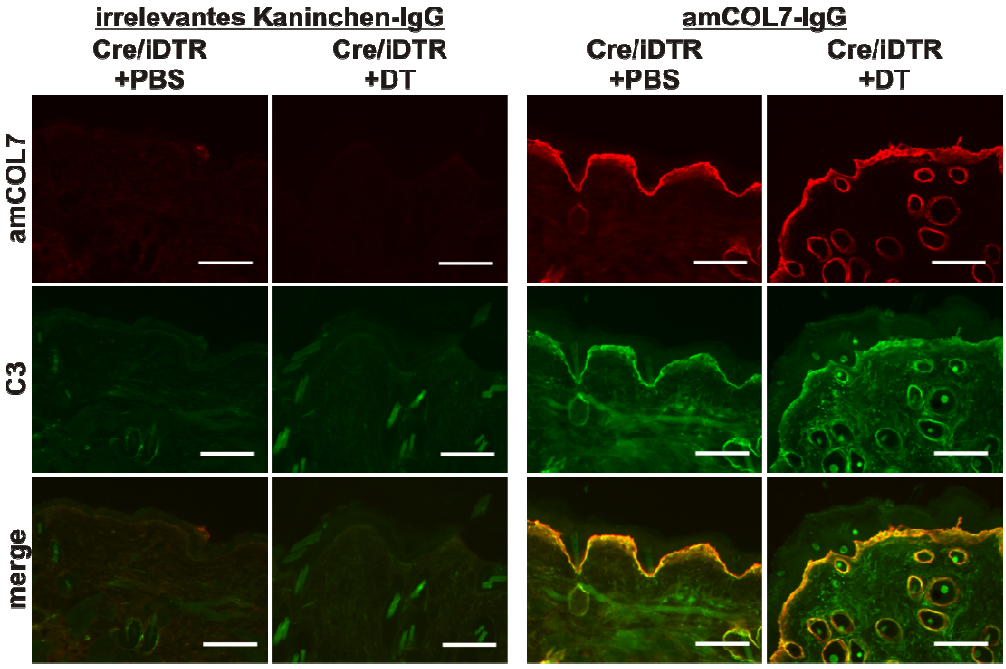


Abb. 3.12: Ablagerung von Kaninchen-IgG und des Komplementfaktors C3 in Cre/iDTR-Mäusen
Dargestellt sind Gefrierschnitte von Hautproben von Mastzell-kompetenten und Mastzell-defizienten Cre/iDTR-Mäusen aus dem unter 3.2.2 beschriebenen Experiment. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte wie in der Legende zu Abb. 3.10 beschrieben.

Zusätzlich wurden Veränderungen des Gewebes in mithilfe der Naphthol AS-D Chlorazetat Esterase-Reaktion gefärbten und mit Hämatoxylin gegengefärbten Paraffinschnitten untersucht. Dabei wird die in den Granula von Mastzellen und Neutrophilen gespeicherte Chlorazetat-Esterase genutzt, um durch Zugabe und Umsetzung ihres Substrates Naphthol AS-D Chlorazetat das Zytoplasma der Zellen anzufärben. Durch Gegenfärbung mit Hämatoxylin werden auch andere Zell- und Gewebestrukturen deutlich.

Alle mit pathogenem amCOL7-IgG behandelten Tiere zeigten eine Entzündung der Haut, welche durch die Infiltration von Neutrophilen in die Dermis, die Verdickung der Epidermis und Schorfbildung charakterisiert war (**Abb. 3.13** bis **3.15**). Weiter war eine deutliche Blasenbildung durch die Spaltung der Epidermis von der Dermis zu beobachten. Tiere, die mit irrelevantem Kaninchen-IgG behandelt wurden, zeigten eine dünne Epidermis ohne Blasenbildung sowie keine Zellinfiltration. Trotz der individuellen Krankheitsverläufe in den einzelnen Mauslinien waren keine qualitativen Unterschiede im histologischen Bild der EBA zu beobachten.

Bindegewebs-Mastzellen waren nur in Hautproben der Wildtyp-Mäuse (C57BL/6J, $WBB6F_1$-*Kit*$^{+/+}$, PBS-behandelte Cre/iDTR) präsent und nicht in Tieren der Mastzell-defizienten Gruppen. Dabei befanden sie sich vorrangig in der dermalen Hautschicht und waren nicht degranuliert.

Im Gegensatz zu den makroskopischen Befunden zeigt die histologische Analyse vergleichbare Ergebnisse sowohl zwischen den jeweiligen Mastzell-defizienten und -kompetenten Mäusen als auch zwischen den einzelnen Mausstämmen. Die beobachteten Differenzen in der klinischen Symptomatik spiegeln sich damit in der Histologie nicht wieder.

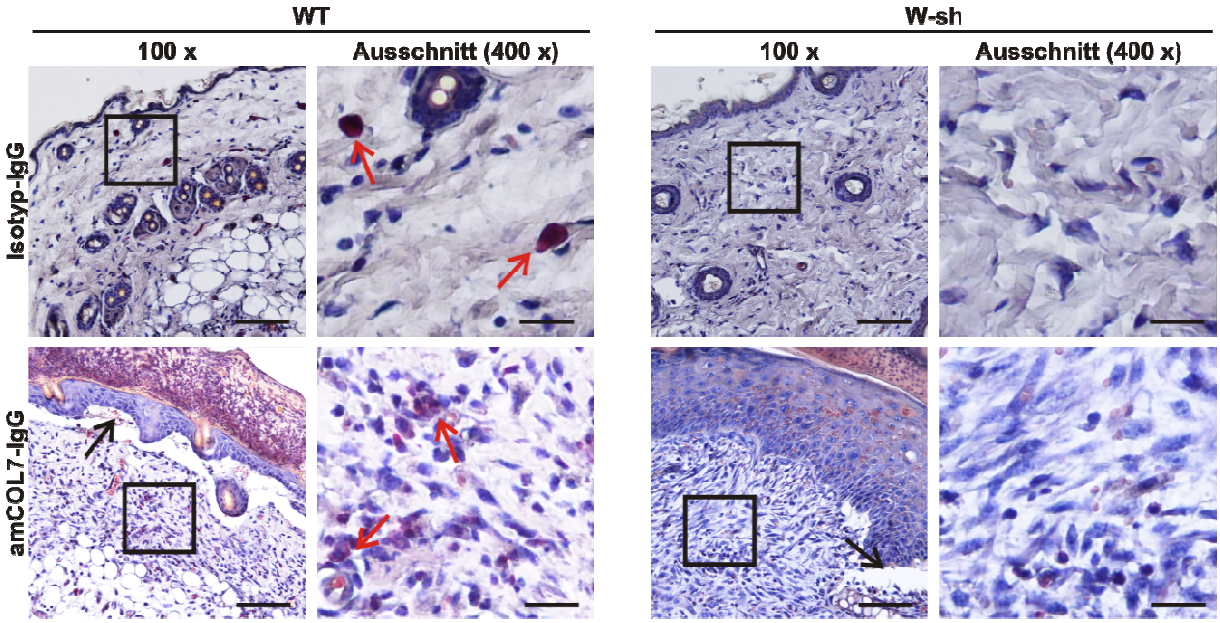


Abb. 3.13: Infiltration von Neutrophilen in die Haut und Blasenbildung in W-sh-Mäusen
Dargestellt sind Paraffinschnitte von Hautproben von W-sh-Mäusen (Spalten drei und vier) und den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen (Spalten eins und zwei) aus dem unter 3.2.1 beschriebenen Experiment. Mastzellen und Neutrophile wurden durch den Substratumsatz der in ihren Granula gespeicherten Chlorazetat-Esterase pink/dunkelviolett angefärbt und das Gewebe mit Hämatoxylin gegengefärbt. Mastzellen stellen sich dabei als große Zellen mit einem leicht gelappten Rand dar (rote Pfeile), während Neutrophile als kleine runde Zellen (untere Reihe) zu erkennen sind. Die Separation von Epidermis und Dermis ist mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet (untere Reihe).
Für jede Versuchsgruppe sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen in 100facher Vergrößerung (100x; Maßstab = 100 µm) und eine weitere Vierfachvergrößerung des gekennzeichneten Ausschnitts direkt daneben dargestellt (400 x; Maßstab = 25 µm).

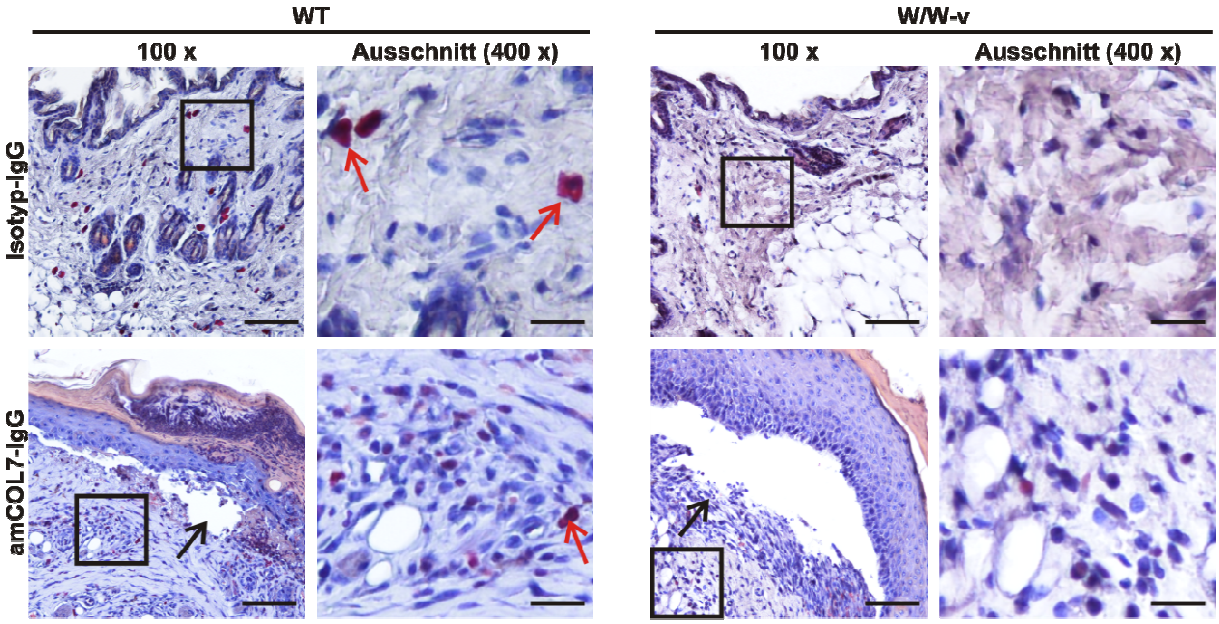


Abb. 3.14: Infiltration von Neutrophilen in die Haut und Blasenbildung in W/W-v-Mäusen
Dargestellt sind Paraffinschnitte von Hautproben von W/W-v-Mäusen (Spalten drei und vier) und den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen (Spalten eins und zwei) aus dem unter 3.2.1 beschriebenem Experiment. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte wie in der Legende zu Abb. 3.13 beschrieben.

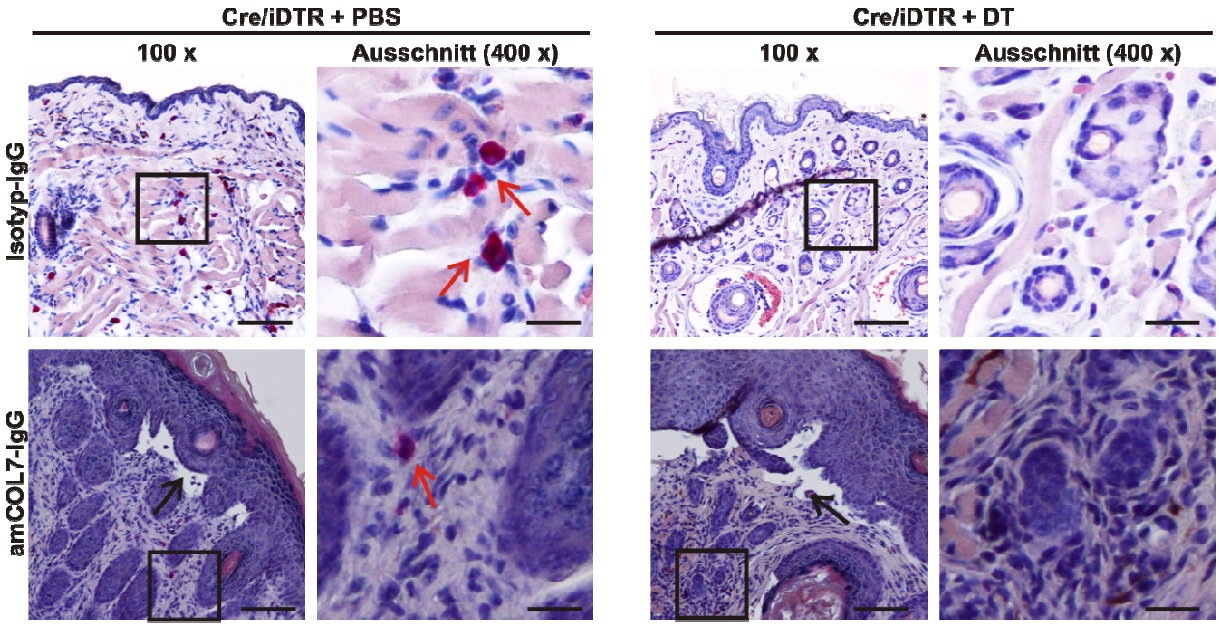


Abb. 3.15: Infiltration von Neutrophilen in die Haut und Blasenbildung in Cre/iDTR-Mäusen
Dargestellt sind Paraffinschnitte von Hautproben von Mastzell-kompetenten (Spalten eins und zwei) und Mastzell-defizienten (Spalten drei und vier) Cre/iDTR-Mäusen aus dem unter 3.2.2 beschriebenen Experiment. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte wie in der Legende zu Abb. 3.13 beschrieben.

3.2.5. Zytokinspiegel und neutrophile Granulozyten in der experimentellen EBA

Die Intensität entzündlicher Prozesse in einem Organismus wird sowohl von der Komposition der jeweiligen zellulären als auch löslichen Bestandteile des Blutes wesentlich mitbestimmt. In einem weiteren Ansatz wurde daher geprüft, ob sich die einzelnen Mausstämme in der experimentellen EBA hinsichtlich verschiedener im Serum nachweisbarer Zytokine unterschieden. Parallel dazu wurde der relative Anteil der neutrophilen Granulozyten, welche die wesentlichen Effektorzellen in der Erkrankung darstellen, in Blutproben durchflusszytometrisch bestimmt.

Für die Bestimmung der Zytokinspiegel in den Mausseren wurden Blutproben an Tag 0 und 16 des in Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2 beschriebenen Experiments abgenommen und die daraus gewonnenen Seren mithilfe des *Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Assay (23-plex)*-Kits von BioRad auf 23 murine Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren untersucht.

Von den 23 untersuchten Molekülen zeigten 21 unabhängig von der verwendeten Mauslinie oder dem jeweiligen Krankheitszustand eine Expression entweder unterhalb der Nachweisgrenze des Messsystems (IL-4, Eotaxin, GM-CSF) oder waren unverändert gegenüber dem Ausgangswert an Tag 0 (IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IFN-γ, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 und TNFα; Daten nicht gezeigt). Lediglich für zwei Moleküle, G-CSF und CXCL1, konnte eine Regulation nachgewiesen werden. So stieg sowohl in den Wildtyp-Kontrollen des W-sh- und W/W-v-Stammes wie auch in den Mastzell-kompetenten Cre/iDTR-Tieren unter Gabe des pathogenen Antikörpers der Spiegel an G-CSF an (**Abb 3.16**). Darüber hinaus lagen zumindest bei W-sh und Cre/iDTR-Mäusen im erkrankten Tier die Konzentrationen dieses Wachstumsfaktors in Mastzell-defizienten Tieren tendenziell niedriger als in den Mastzell-kompetenten Kontrollen vor. Ein vergleichbarer Verlauf ließ sich für das Chemokin CXCL1 in W/W-v und Cre/iDTR-Tieren und ihren Mastzell-kompetenten Kontrollen nachweisen (**Abb 3.16**). Eine direkte Korrelation zwischen dem klinischen Verlauf der Erkrankung in den drei Mausstämmen (**Abb. 3.9**) und der Zytokinexpression im Serum ergab sich damit nicht.

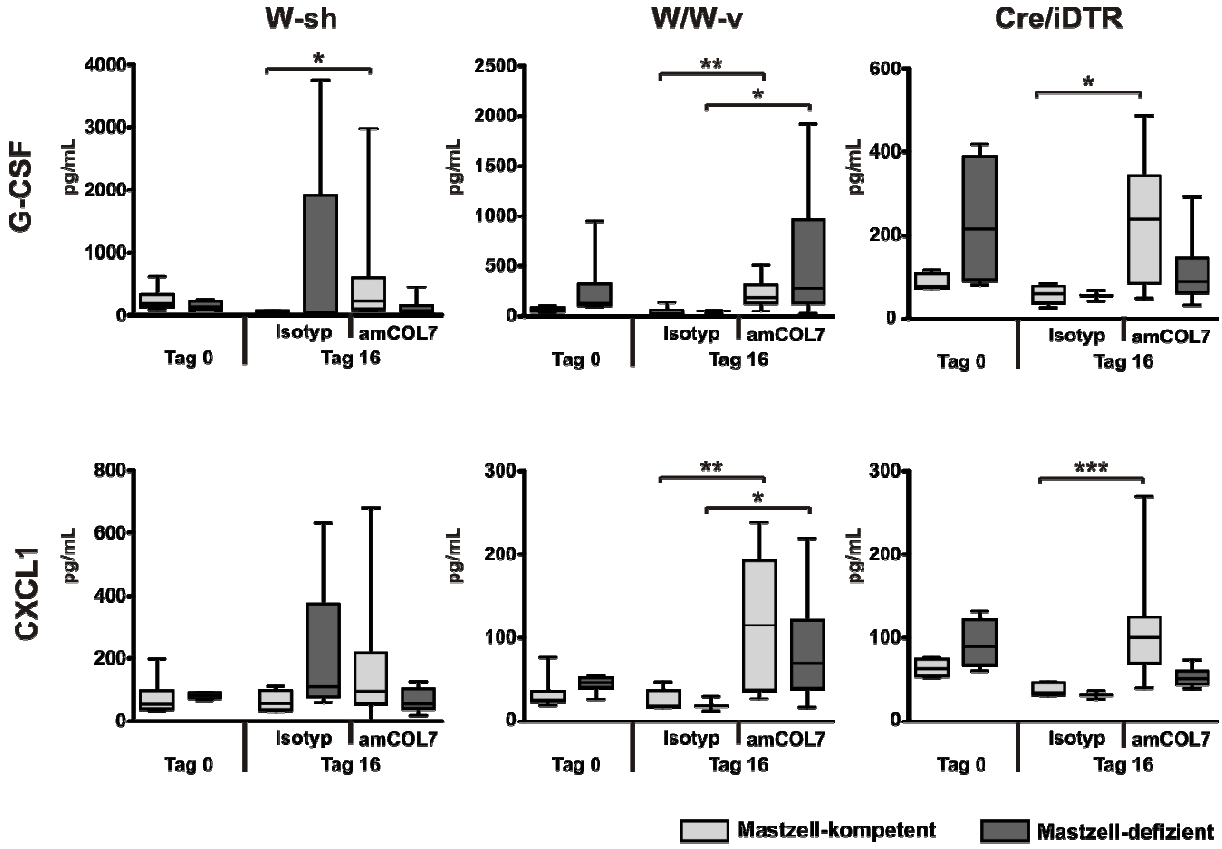


Abb. 3.16: Regulierte Zytokine im Blut der Mastzell-defizienten Mauslinien
Mäusen der unter 3.2.1 und 3.2.2 beschriebenen Experimente wurde an den Tagen 0 und 16 des Versuchs Blut abgenommen und die Konzentrationen von 23 Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren mithilfe des Zytokin-Bead-Array-Systems (Bioplex) von Luminex in den Seren gemessen. Dargestellt sind die Zytokine, die in mindestens einem der drei Stämme eine krankheitsspezifische Regulation aufweisen. Die Daten repräsentieren zwei unabhängige Experimente der W-sh- (linke Spalte), W/W-v- (mittlere Spalte) und Cre/iDTR-Linie (rechte Spalte) und sind als Boxplots mit Antennen (nach Tukey) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Kruskal-Wallis Tests und der Vergleich der einzelnen Gruppen miteinander mithilfe des Dunn's Multiple Comparison Tests. Statistisch signifikante Unterschiede sind als Stern gekennzeichnet (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Veränderungen im *c-Kit*-Gen beeinflussen nicht nur die Ausreifung von Mastzellen sondern auch die anderer Zellen wie beispielsweise Neutrophile. Da die letzteren Zellen eine essenzielle Rolle in der Pathogenese der EBA spielen[78], wurde im Parallelansatz zu den Zytokinen der relative Anteil an Neutrophilen im Blut der Mäuse überprüft.
Dazu wurden den einzelnen Mastzell-defizienten Tieren und den entsprechenden Mastzell-kompetenten Kontrollen Blutproben entnommen, die Zellen mit dem Neutrophilen-Marker NIMP-R14 gefärbt und am Durchflusszytometer gemessen. Die Leukozytenpopulation wurde zunächst im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht anhand ihrer Zellgröße und –granularität

identifiziert (Daten nicht gezeigt) und anschließend innerhalb dieser Population die mithilfe des Neutrophilen-Markers NIMP-R14 gekennzeichneten Neutrophilen bestimmt. Da der Antikörper des Klons NIMP-R14 z.T. auch auf Monozyten bindet, wurde die Neutrophilenpopulation durch Auftragung der Fluoreszenzintensität (Exzitation 492 nm/Emission 516 nm) gegen die Zellgranularität (SSC) als Zellpopulation mit hoher Fluoreszenzintensität und Granularität definiert (**Abb. 3.17 A**) und ihr Anteil an der Gesamt-Leukozytenzahl ermittelt. Diese Daten wurden für jede Versuchsgruppe zusammengefasst und miteinander verglichen (**Abb. 3.17 B**). Dabei wiesen die Mastzell-defizienten Mäuse der W/W-v-Linie einen signifikant reduzierten Anteil an Neutrophilen im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen auf (p = 0,041; *). Diese verringerte Zahl an Neutrophilen war tendenziell ebenfalls in den W-sh-Mäusen gegenüber den Wildtyp-Kontrollen zu beobachten (p = 0,114; ns). Im Gegensatz dazu besaßen die Mastzell-defizienten Mäuse der Cre/iDTR-Linie und ihre Mastzell-kompetenten Kontrollen vergleichbare Anteile an Neutrophilen (p = 0,691; ns).

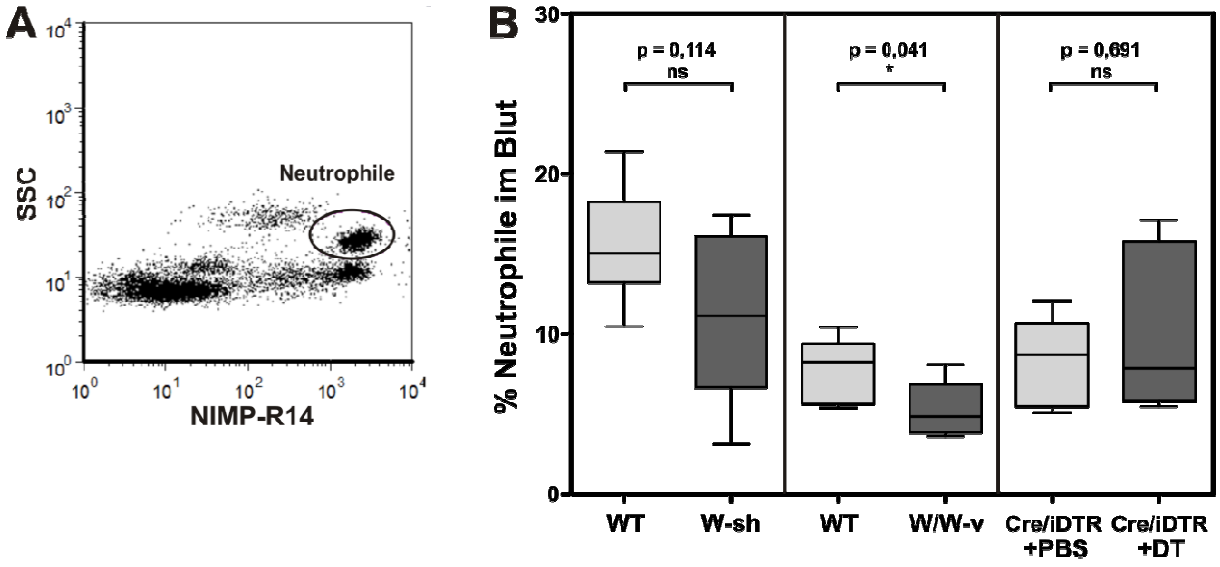


Abb. 3.17: Relativer Anteil der Neutrophilen im Blut von W-sh-, W/W-v- und Cre/iDTR-Mäusen
Mäusen der W-sh-, W/W-v- und Cre/iDTR-Linie wurde Blut abgenommen und nach der Färbung der Zellen mit dem Antikörper NIMP-R14 der relative Anteil der Neutrophilen an der Gesamtzellzahl mithilfe der Durchflusszytometrie bestimmt.
(**A**) Exemplarische Darstellung der Neutrophilenpopulation anhand der Zellgranularität (SSC) und Fluoreszenzintensität im Seitwärtsstreulicht/Fluoreszenzintensitäts-Diagramm. Der prozentuale Anteil der Neutrophilen an der Leukozytenpopulation wurde mithilfe der FCS Express Software berechnet. (**B**) Ermittelte Neutrophilenanteile an der Gesamtzellzahl als Boxplots mit Antennen (nach Tukey). Die Daten repräsentieren sechs (W-sh und W/W-v) bzw. fünf (Cre/iDTR) Tiere je Gruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Mastzell-defizienten und -kompetenten Mäusen eines Stammes wurden mittels des Mann-Whitney Tests berechnet und sind angegeben.

Während damit die geringen Unterschiede in den Neutrophilenzahlen zwischen Mastzell-defizienten und -kompetenten Tieren bei den Stämmen W/W-v und Cre/iDTR mit dem klinischen Schweregrad korrelieren (**Abb. 3.9**), ergibt sich kein solcher positiver Zusammenhang zwischen Wildtyp und W-sh-Stamm. Insgesamt weisen W-sh-Mäuse und ihre Wildtyp-Kontrollen jedoch höhere Neurophilenzahlen als die anderen Stämme auf. Dies könnte einen Grund für ihre allgemein höhere Suszeptibilität gegenüber der EBA darstellen.

3.2.7 Aktivierung der Mastzellen im lokalen Modell der EBA

Das bisher verwendete systemische Modell der EBA bildet den akuten Entzündungsprozess vor allem in seiner mittleren bis späten Phase (4 bis 16 Tage) ab. Um initiale Prozesse innerhalb der ersten 72 Stunden erfassen zu können, eignet sich dieses Modell auf Grund seiner Trägheit und fehlenden Präzision in der Vorhersehbarkeit einer lokalen Manifestation nur bedingt. Um die frühe Phase der Entzündung analysieren zu können, wurde im Folgenden in Adaption an ein bereits für das experimentelle BP beschriebenes Verfahren[125] ein lokales passives Krankheitsmodell der EBA in unserer Arbeitsgruppe etabliert. In diesem Modell wird der pathogene Antikörper einmalig intradermal in die Ohrbasis injiziert, woraufhin es innerhalb von 24 Stunden zur lokalen Entzündungsreaktion und Blasenbildung im Bereich der Injektionsstelle kommt.
Um die Rolle von Mastzellen im frühen Entzündungsprozess der EBA zu klären, wurden Mäuse der doppelt transgenen Cre/iDTR-Linie entweder mit DT oder PBS vorbehandelt. Da die Erkrankung am Ohr untersucht werden sollte und hier die natürliche Mastzellzahl höher als in anderen Körperregionen ist, wurden die Mäuse zusätzlich zu den vier Injektionen (i.p.) noch mit zwei weiteren Injektionen subkutan in die Ohrbasis behandelt. Dadurch konnte die Abreicherung der Mastzellen im Ohr von 76% (Abschnitt 3.2.2) auf 96,3% verbessert werden (**Abb. 3.19**).

Durch ihre Aktivierung setzen Mastzellen verschiedene Mediatoren wie beispielsweise Histamin frei. Durch die vasoaktive Funktion dieses Moleküls wird die Permeabilität der Blutgefäße erhöht, wodurch vermehrt Plasma den Blutkreislauf verlassen und in das Gewebe eindringen kann. Dieser Vorgang führt zur sogenannten Ödembildung, also der Schwellung des Gewebes durch das Austreten von Flüssigkeit aus dem Gefäßsystem und dessen Ansammlung im interstitiellen Raum. Mit dem Flüssigkeitsaustritt diffundieren auch Proteine in das Gewebe, die zuvor aufgrund ihrer Größe die Gefäßwand nicht passieren konnten. Mithilfe des Farbstoffes Evans Blue kann die Ödembildung im lebenden Organismus sichtbar gemacht werden. Dieser Farbstoff bindet an Serumalbumin im Blut und

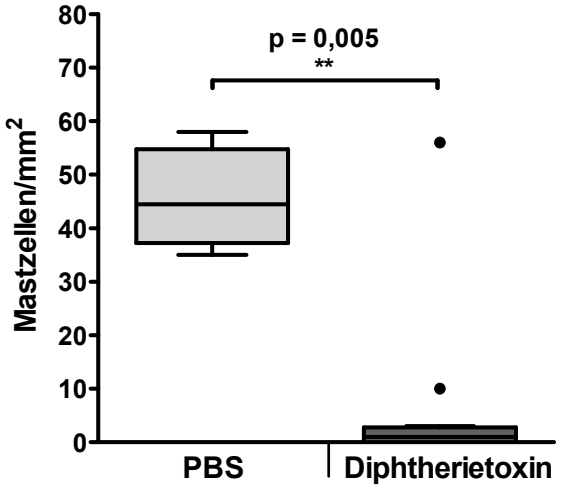


Abb. 3.19: Depletion der Bindegewebs-Mastzellen im Ohrgewebe von Cre/iDTR-Mäusen

Doppelt transgene Cre/iDTR-Mäuse wurden entweder mit Diphtherietoxin (4x25 ng/g KG (i.p.) im wöchentlichen Intervall und 2x5 ng/g KG (s.c.) sechs und zwei Tage vor Versuchsbeginn) oder mit dem äquivalenten Volumen PBS behandelt. Die Anzahl der Mastzellen wurde mikroskopisch in Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase-gefärbten Gewebeschnitten bestimmt. Ausgezählt wurde ein Schnitt pro Ohr und beide Ohren pro Maus (PBS n = 4; DT n = 12), hier dargestellt als Boxplots mit Antennen (nach Tukey). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels des Mann-Whitney Tests ermittelt und sind als Stern gekennzeichnet.

kann daher den Blutkreislauf nur verlassen, wenn die Gefäßpermeabilität der Blutgefäße so erhöht wird, dass auch Serumalbumin ins Gewebe eindringen kann.

Um nun eine Mastzellaktivierung und die damit einhergehende Ödembildung durch Immunkomplexe in den Mäusen sichtbar zu machen, wurde den Mäusen 1% Evans Blue in die Schwanzvene appliziert. Anschließend erfolgte die Applikation des amCOL7-IgGs in die linke und des irrelevanten IgGs desselben Isotyps in die rechte Ohrbasis aller Tiere. Bereits innerhalb von zehn Minuten nach der Antikörper-Injektion trat der Farbstoff Evans Blue massiv aus den Blutgefäßen in das Gewebe um die Einstichstelle von Mastzell-kompetenten Mäusen, wodurch es zu einer dunkelblauen Verfärbung ausschließlich der Ohrbasis kam (17 von 17). Indessen blieb die Ohrbasis der Mastzell-defizienten Tiere unverändert hellblau/weiß (8 von 10) (**Abb. 3.20; Anhang Abb. A.1**). Überraschenderweise hing die Ödembildung zwar von der Präsenz von Mastzellen, nicht jedoch von der Spezifität des applizierten Antikörpers ab.

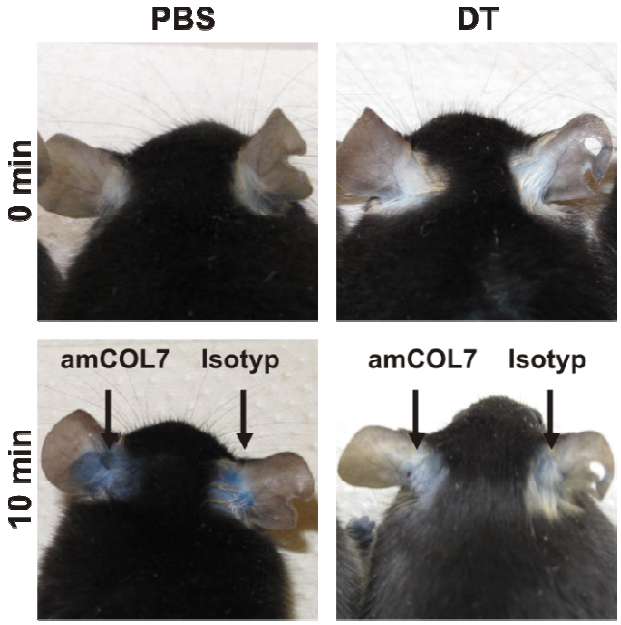


Abb. 3.20: Extravasation des Farbstoffes Evans Blue nach intradermaler IgG-Injektion
Doppelt transgene Cre/iDTR-Mäuse wurden entweder mit PBS (Mastzell-kompetent) oder DT (Mastzell-defizient) vorbehandelt und erhielten nachfolgend 1% Evans Blue in die Schwanzvene injiziert. Anschließend erfolgte die intradermale Administration des pathogenen amCOL7-IgG in die linke und des irrelevanten Isotyps in die rechte Ohrbasis. Die Fotos zeigen je eine Maus pro Gruppe vor und zehn Minuten nach der Antikörper-Injektion (repräsentativ für 17 (PBS) bzw. 10 (DT) Mäuse; siehe Anhang Abb. A.1).

Die Verfärbung des Gewebes aller Mäuse war während des gesamten Beobachtungszeitraums von einer Stunde deutlich sichtbar und stabil. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich in den Mastzell-defizienten Tieren um eine verzögerte Reaktion handelte.

Zur Quantifizierung der Extravasation des Farbstoffes wurde dieser aus den Ohren von sieben (DT) bzw. neun (PBS) Tieren pro Gruppe extrahiert und photometrisch bestimmt. Dabei bestätigten sich die zuvor an den Mäusen optisch wahrgenommenen Unterschiede. Die im Gewebe nachweisbare Menge Evans Blue war in den Isotyp-behandelten und amCOL7-IgG-behandelten Ohren in beiden Versuchsgruppen vergleichbar (**Abb. 3.21**). Im Gegensatz dazu wiesen die Mastzell-defizienten Tiere deutlich niedrigere Werte auf als die Mastzell-kompetenten Mäuse. Dieser Effekt war sowohl in den Isotyp-behandelten Ohren, (16,2 µg/mL vs. 8,7 µg/mL; $p = 0{,}004$; **) als auch den amCOL7-IgG-behandelten Ohren (21,3 µg/mL vs. 8,9 µg/mL; $p = 0{,}1142$; ns) stark ausgeprägt. Für letztere Gruppe ergab sich jedoch aufgrund des geringeren Probenumfanges ($n = 7$) keine statistische Signifikanz.

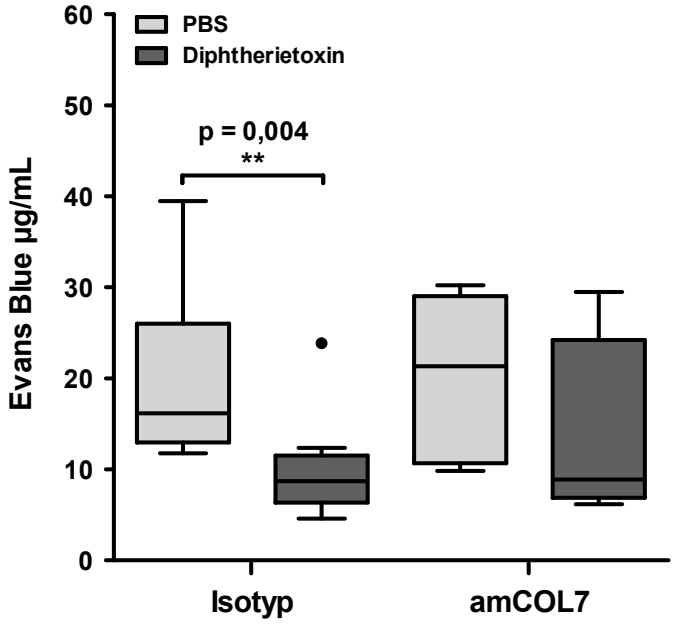


Abb. 3.21: Quantifizierung des ins Gewebe ausgetretenen Farbstoffes Evans Blue
Mäusen des unter Abb. 3.20 dargestellten Versuchsansatzes wurden nach einer Stunde die Ohren entnommen, der Farbstoff Evans Blue extrahiert und die Farbstoffmenge photometrisch bestimmt. Die Daten wurden als Boxplots mit Antennen (nach Tukey) dargestellt und umfassen neun (PBS) bzw. sieben (DT) Ansätze. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Mann-Whitney Tests zwischen Mastzell-defizienten (DT) und Mastzell-kompetenten (PBS) Gruppen. (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$)

Aus den bisherigen Befunden geht hervor, dass die Applikation von IgG, unabhängig von dessen Spezifität, nur in Mastzell-kompetenten Tieren eine Ödembildung vermittelt. Um zu klären, ob dies durch eine Degranulation der Mastzellen begleitet wird, wurden diese Zellen in Gewebeschnitten der Ohrbasis mithilfe der Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase-Reaktion angefärbt und die Anzahl degranulierter Mastzellen bestimmt (**Abb. 3.23**). In Mastzell-kompetenten Mäusen setzten 40% aller Mastzellen nach Antikörpergabe ihre Granula frei, wobei kein Unterschied zwischen den Isotyp- und den amCOL7-behandelten Proben beobachtet wurde ($p = 0,1605$; ns). Die Ergebnisse zeigen, dass Mastzellen nach der intradermalen Injektion von Antikörpern aktiviert werden und legen nahe, dass die Mastzell-abhängige Ödembildung auf die Degranulation dieser Zellen zurückzuführen ist.

In einem weiteren Kontrollansatz wurde nun geklärt, ob die beobachtete Ödembildung der Applikation von Antikörpern bedarf oder ob die Injektion von Puffer, also die rein physische Irritation des Gewebes, bereits für eine Mastzell-Aktivierung ausreichend ist.
Dazu wurde drei weiteren doppelt transgenen Cre/iDTR-Mäusen PBS in die rechte und irrelevantes Kaninchen-IgG (Isotyp) in die linke Ohrbasis intradermal appliziert. Die Mastzell-

kompetenten Tiere zeigten innerhalb von zehn Minuten nach der Injektion eine deutliche Blaufärbung der Ohrbasis, unabhängig ob Puffer oder Antikörper appliziert wurde (**Abb. 3.22**).

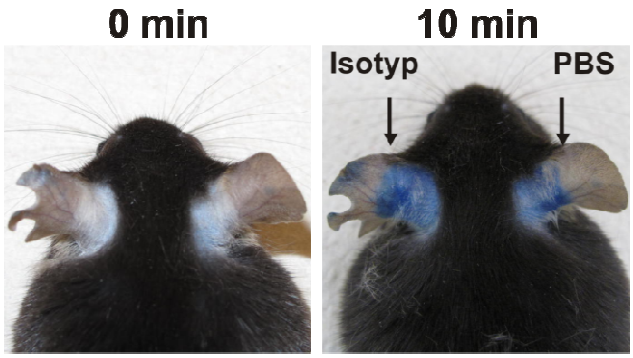


Abb. 3.22: Extravasation des Farbstoffes Evans Blue nach intradermaler Injektion von IgG oder PBS

Unbehandelten, doppelt transgenen Cre/iDTR-Mäusen (n = 3) wurde 1% Evans Blue in die Schwanzvene injiziert, gefolgt von der intradermalen Administration von PBS in die rechte und des Isotyp-IgGs in die linke Ohrbasis. Die Fotos zeigen eine Maus (repräsentativ für drei Tiere) direkt vor und zehn Minuten nach der Antikörper-Injektion.

Die histologische Auswertung der Proben erbrachte, dass sowohl in Puffer-behandelten als auch in Antikörper-behandelten Proben knapp 40% der vorliegenden Mastzellen degranuliert waren (**Abb. 3.23**).

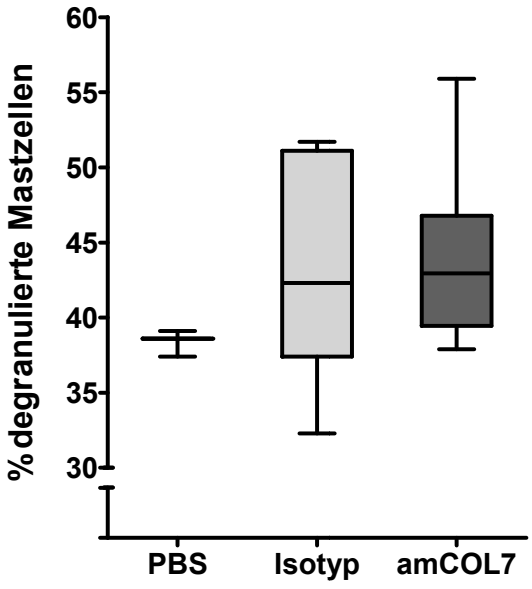


Abb. 3.23: Anteil degranulierter Mastzellen im Gewebe nach einer intradermalen Injektion

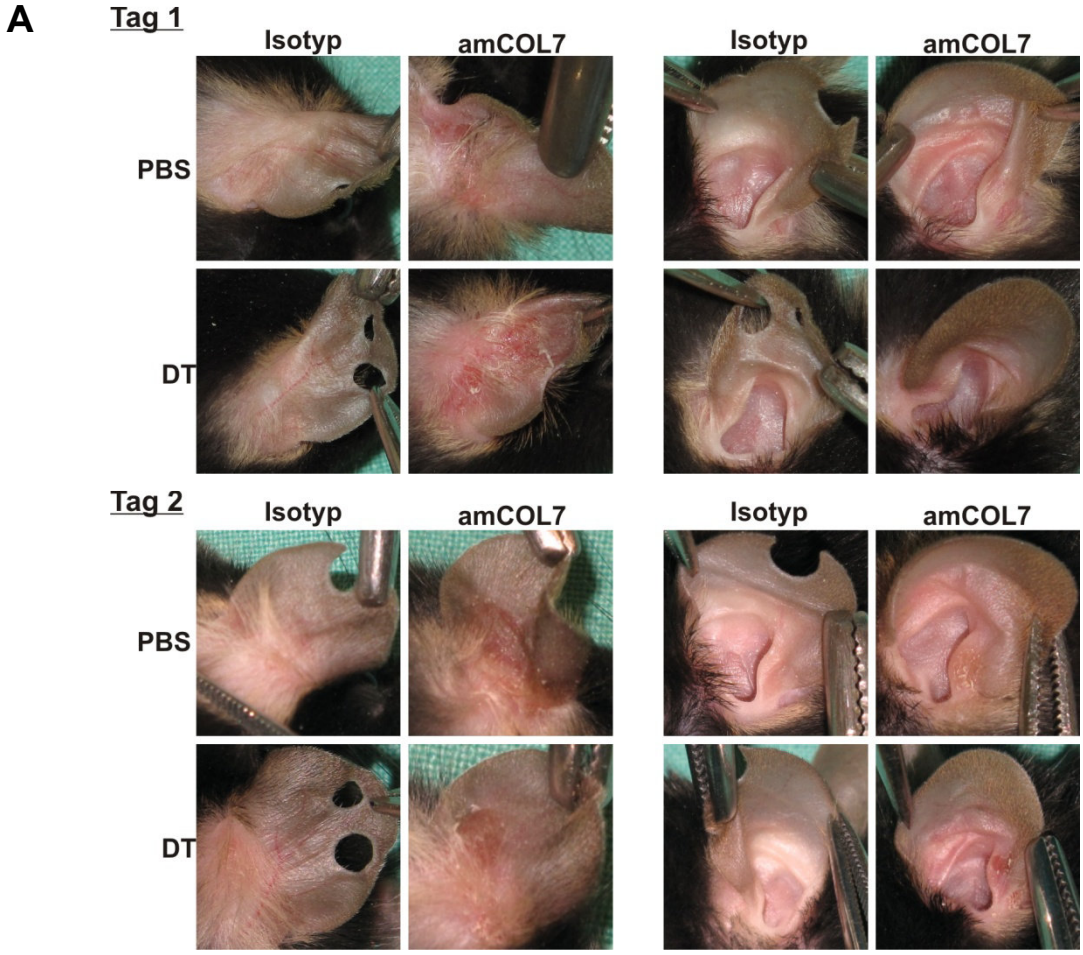
Mäusen des unter Abb. 3.20 und 3.22 dargestellten Versuchsansatzes wurden nach einer Stunde die Ohren entnommen und die Mastzellen mithilfe der Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase-Reaktion in Gewebeschnitten angefärbt. Die Anzahl ruhender und degranulierter Mastzellen wurde mikroskopisch in einem Schnitt pro Ohr bestimmt und daraus der prozentuale Anteil degranulierter Mastzellen berechnet. Die Daten wurden als Boxplots mit Antennen (nach Tukey) dargestellt (PBS: n = 3; Isotyp: n = 11; amCOL7: n = 8). Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Kruskal-Wallis Tests (p = 0,344, ns), woraufhin kein Vergleich der Einzelgruppen mehr vorgenommen wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Mastzellen bereits durch die physische Irritation der intradermalen Injektion zur Degranulation stimuliert werden und die Bildung von Ödemen vermitteln. Es blieb daher zu klären, ob die unspezifische Aktivierung von Mastzellen neben der Ödembildung ebenfalls an der Pathogenese der EBA im lokalen Modell beteiligt ist.

3.2.8 Die Rolle von Mastzellen im lokalen Modell der EBA

Die vorhergehenden Befunde im systemischen, passiven Krankheitsmodell zeigen, dass Mastzellen nicht an der späteren Phase der Entzündungsreaktion beteiligt sind. Nachdem die letzten Ergebnisse ihre unspezifische Aktivierung innerhalb weniger Minuten nach einer intradermalen Injektion nachwiesen, sollte im Folgenden die Rolle von Mastzellen in der Pathogenese der EBA im lokalen Modell untersucht werden.

Mastzellen wurden, wie bereits in Abschnitt 3.2.7 beschrieben, in doppelt transgenen Cre/iDTR-Mäusen mit DT depletiert, während Kontrolltiere mit PBS vorbehandelt wurden.
Die Mäuse erhielten anschließend intradermal das pathogene amCOL7-IgG in die linke und das irrelevante Kaninchen-IgG (Isotyp) in die rechte Ohrbasis und wurden nach 24 und 48 Stunden auf Hautläsionen am Ohr untersucht. Bereits 24 Stunden nach der Antikörper-Applikation hatte sich eine deutliche, lokale Entzündung an den Ohren entwickelt, die den pathogenen Antikörper erhalten hatten. Diese manifestierte sich in Form von Rötung, Schorf und Ablösung der Epidermis. Ohren, die Antikörper des Isotyps erhalten hatten, wiesen keine Läsionen auf und blieben vollständig gesund (**Abb. 3.24 A**). Dabei zeigte, im Gegensatz zum systemischen Krankheitsmodell, die Mastzell-defiziente Gruppe hier einen leicht milderen Phänotyp als die Mastzell-kompetente Kontrolle (**Abb. 3.24 B**). Während in Mastzell-kompetenten Mäusen der Befall mit etwa 35% der Oberfläche bereits 24 Stunden nach der Antikörpergabe maximal war, lag der Befall in den Mastzell-defizienten Tieren mit etwa 22% signifikant unterhalb dieses Wertes ($p = 0{,}0366$; *). Diese Diskrepanz ließ sich 48 Stunden nach der Antikörpergabe nicht mehr nachweisen. Hier zeigten die Mastzell-defizienten Tiere eine Zunahme des Befalls und damit einen identischen Schweregrad der Entzündung wie die PBS-behandelten Tiere ($p = 0{,}2959$; ns).
Im Gegensatz zum Vortag waren an Tag 2 auch die Isotyp-injizierten Ohren von geringen Hautläsionen betroffen. Diese sind vermutlich auf aus dem Injektionsbereich ausgeschwemmten pathogenen Antikörper zurückzuführen.



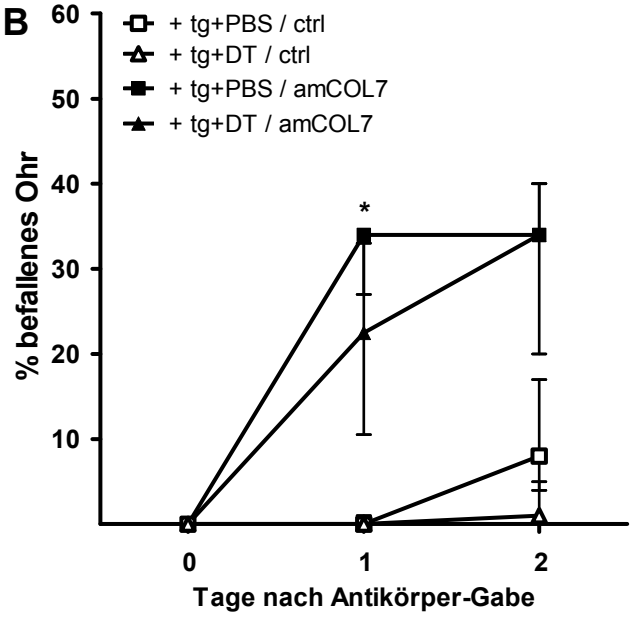


Abb. 3.24: Lokal induzierte EBA in Mastzell-defizienten Mäusen

Doppelt transgene Cre/iDTR-Mäuse wurden entweder mit PBS (Mastzell-kompetent) oder DT (Mastzell-defizient) vorbehandelt. Allen Tieren wurde dann intradermal 0,6 mg amCOL7-IgG in die eine und Isotyp in die andere Ohrbasis injiziert und die Ohren nach 24 (Tag 1) und 48 (Tag 2) Stunden auf Hautläsionen untersucht. (**A**) Dargestellt sind repräsentative Befunde der Hautläsionen mit Schorf, Rötung und Ablösung der Epidermis sowie (**B**) die quantitative Bestimmung des Befalls der Oberfläche. Die Daten sind als Mediane mit Interquartilsabstand angegeben und repräsentieren zwei unabhängige Experimente. Signifikante Unterschiede zwischen den amCOL7-behandelten Gruppen wurden für jeden Zeitpunkt mittels Mann-Whitney Test berechnet und mit einem Stern gekennzeichnet. (*, $p < 0,05$)

An Tag 2 wurden die Ohren aller Mäuse entnommen und die Ablagerung des im Experiment injizierten Kaninchen-IgG und des Komplementfaktors C3 mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Mitgeführte Färbekontrollen (Negativkontrolle, Isotypkontrolle, Sekundärantikörper-Kontrolle) zur Überprüfung unspezifischer Bindungen der Antikörper sowie zur Identifizierung von autofluoreszierenden Gewebestrukturen wiesen kein Fluoreszenzsignal auf. Alle mit amCOL7-behandelten Ohren zeigten eine deutliche Ablagerung beider Komponenten in räumlicher Nähe zueinander an der dermal-epidermalen Junktionszone (**Abb. 3.25**). Aber auch in einigen Proben der Isotyp-behandelten Ohren war die Ablagerung des pathogenen amCOL7-IgGs bzw. des Komplementfaktors C3 zu finden. Das deutet darauf hin, dass der Antikörper trotz der intradermalen Injektion nicht ausschließlich an der Injektionsstelle bleibt, sondern sich mit der Zeit (innerhalb von 48 Stunden) weiter im Organismus verteilt. Dies korreliert mit dem verzögerten Befall der mit Isotyp behandelten Ohren an Tag 2.

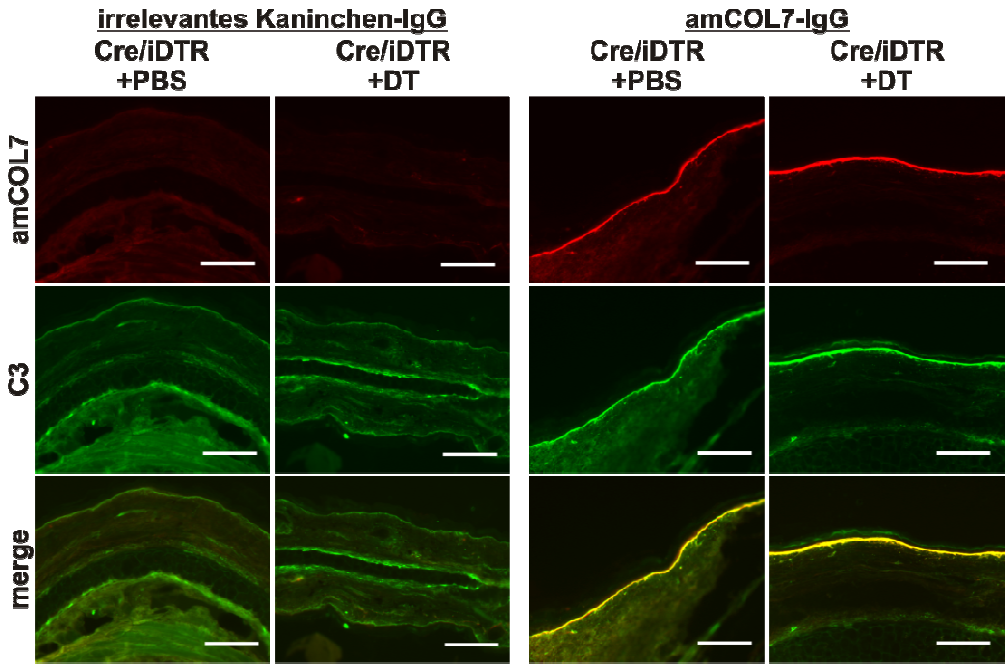


Abb. 3.25: Ablagerung von Kaninchen-IgG und des Komplementfaktors C3 in der lokal induzierten EBA

Dargestellt sind Gefrierschnitte von Hautproben der Ohren von Mastzell-kompetenten (PBS) und Mastzell-defizienten (DT) Cre/iDTR-Mäusen aus dem in Abb. 3.24 A dargestellten Experiment. Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurde in diesen Schnitten die Ablagerung von Kaninchen-IgG (obere Reihe) und des Komplementfaktors C3 (mittlere Reihe) sowie deren räumliche Nähe zueinander (untere Reihe) an der DEJ im Fluoreszenzmikroskop detektiert. Repräsentative Gewebeproben der mit Isotyp-behandelten Ohren sind links (erste und zweite Spalte), Proben der Ohren, die amCOL7-IgG erhalten haben, rechts (dritte und vierte Spalte) dargestellt. (Maßstab = 100 µm)

In mithilfe der Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase-Reaktion angefärbten Paraffinschnitten der Hautproben aus dem Ohrbereich konnten Mastzellen und Neutrophile nachgewiesen werden. Dabei war in allen Proben der amCOL7-behandelten Ohren eine Infiltration von Neutrophilen in das Gewebe der Haut sowie eine Verdickung der Epidermis mit Separation von der Dermis zu beobachten (**Abb. 3.26**). Diese Befunde waren in Mastzell-kompetenten und Mastzell-defizienten Mäusen vergleichbar. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass zu diesem Zeitpunkt auch Gewebeproben der Ohren, die nur irrelevanten Antikörper erhalten hatten, vereinzelt eine verdickte Epidermis und ein Einwandern von Neutrophilen aufwiesen (**Abb. 3.26, zweite Spalte**). Dies entsprach den makroskopischen Befunden und ist durch das Ausschwemmen von pathogenen Antikörpern aus dem gegenüberliegenden Ohr zu erklären. In zukünftigen Experimenten sollte daher pathogener und irrelevanter Antikörper auf zwei verschiedene Tiere verteilt werden.

Für das lokale, passive Modell der EBA lässt sich schlussfolgern, dass allein durch die physische Irritation der intradermalen Injektion Mastzellen aktiviert werden und einhergehend mit ihrer Degranulation zur Ödembildung beitragen. Weiterhin legt die verzögerte klinische Symptomatik der EBA in den Mastzell-defizienten Mäusen nahe, dass die unspezifische Aktivierung der Mastzellen den frühen Entzündungsprozess der Erkrankung beschleunigt, Mastzellen aber dennoch keine essenzielle Rolle in der Pathogenese der EBA spielen.

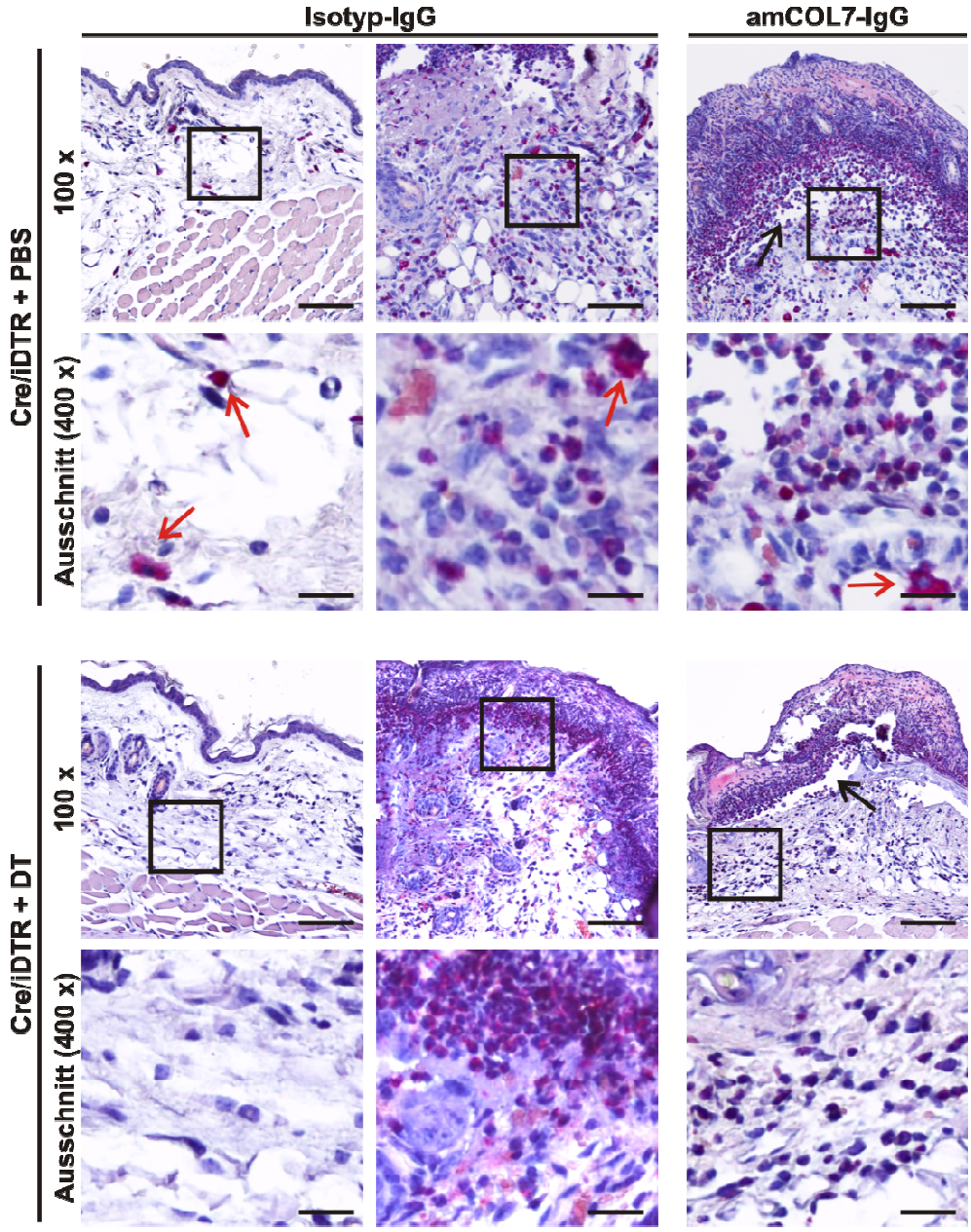


Abb. 3.26: Infiltration von Neutrophilen in die Haut und Blasenbildung in der lokal induzierten EBA

Mastzellen und Neutrophile wurden in Paraffinschnitten der Ohrproben von unter Abb. 3.24 A gezeigten Mastzell-kompetenten (obere zwei Reihen) und Mastzell-defizienten (untere zwei Reihen) Cre/iDTR-Mäusen mithilfe der Naphthol AS-D Chlorazetat-Esterase-Reaktion angefärbt und das Gewebe mit Hämatoxylin gegengefärbt. Beide Zelltypen stellen sich als pinke/dunkelrote Zellen dar, wobei sich Mastzellen (rote Pfeile) anhand ihres größeren Zellumfangs von den Neutrophilen (kleine runde Zellen; Spalten zwei und drei) unterscheiden lassen. Die Separation von Epidermis und Dermis ist mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet (rechte Spalte). Gewebeproben von Isotyp-behandelten Ohren (Spalten eins und zwei) ohne (Spalte eins) und mit (Spalte zwei) klinischen Symptomen bzw. von amCOL7-behandelten Ohren (Spalte drei) sind für jede Versuchsgruppe in repräsentativen Aufnahmen in 100facher Vergrößerung (100x; Maßstab = 100 µm) und einer weiteren Vierfachvergrößerung des gekennzeichneten Ausschnitts direkt darunter dargestellt (400 x; Maßstab = 25 µm).

4. Diskussion

In einer Reihe von Studien am Menschen und in verschiedenen Tiermodellen konnte Mastzellen eine wichtige Rolle in der Autoimmunität zugeordnet werden.[115,123,126,127,147,148] Aufgrund dieser Befunde erscheinen Mastzellen heute als neues therapeutisches Ziel in der Behandlung dieser chronischen Erkrankungen. Neueste Untersuchungen stellen jedoch eine Reihe dieser Ergebnisse in Frage, sodass die Bedeutung von Mastzellen in diesem Krankheitsgeschehen im Zentrum einer kontrovers geführten Debatte steht.
Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Rolle von Mastzellen in der Autoimmunerkrankung Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) in verschiedenen Modellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. Dabei sollte herausgefunden werden, ob und wie Mastzellen während einer EBA aktiviert werden und wie sie zu deren Pathogenese beitragen könnten.
Während Befunde *in vitro* für eine potenzielle Aktivierbarkeit von Mastzellen in der Antikörper-vermittelten Autoimmunreaktion sprachen und die Aktivierung von Mastzellen in einem lokalen Transfermodell tatsächlich nachgewiesen werden konnte, konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen Mastzellaktivierung und Pathogenese der EBA im Tierexperiment widerlegt werden.

Die potenzielle Beteiligung von Mastzellen an der frühen Entzündungsphase der EBA

Zu Beginn einer Entzündungsreaktion kommt es durch Faktoren wie beispielsweise Immunkomplexe zur Aktivierung des Komplementsystems und damit auch zur Freisetzung des Anaphylatoxins C5a. Dieses Spaltprodukt des Komplementsystems besitzt pleiotrope Effekte in der Immunreaktion, über die es wesentlich an der Initiation einer Entzündung beteiligt ist. So vermittelt C5a die Rekrutierung von Neutrophilen, Makrophagen und anderen Leukozyten an den Entzündungsort und induziert die Freisetzung von in Granula gespeicherten Enzymen sowie die Produktion von Sauerstoff-Radikalen vor allem in neutrophilen Granulozyten. Aufgrund dieser Eigenschaften stellt C5a einen potenten proinflammatorischen Mediator dar und nimmt zusammen mit Immunkomplexen eine bedeutende Rolle in der frühen lokalen Entzündungsreaktion ein.[76,149]
Eine Aktivierung von Mastzellen mit diesen beiden Faktoren würde die Beteiligung von Mastzellen an Entzündungsprozessen der EBA bekräftigen.

In Übereinstimmung mit mehreren früheren Studien[150–152] konnte ich in der Tat zeigen, dass humane Hautmastzellen durch das Anaphylatoxin C5a aktiviert werden. C5a induzierte dabei eine deutliche Degranulation der Mastzellen und damit die Freisetzung zahlreicher

vorgeformter Mediatoren, die den Entzündungsprozess der EBA entscheidend beeinflussen könnten.
Eine verzögerte Ausschüttung von Mediatoren, wie beispielsweise von Chemokinen oder Zytokinen, war nach der Aktivierung mit C5a überraschenderweise nicht nachweisbar. Auch die Genexpression der Mastzellen wurde von der Stimulation mit C5a nicht relevant beeinflusst. Ein Grund für den letzteren Befund könnte die Beschränkung auf einen einzigen Messzeitpunkt (4 Stunden nach Beginn der Stimulation) sein, bei der sehr schnelle oder stark verzögerte Regulationen nicht erfasst werden. Es ist jedoch auch möglich, dass dieses Stimulationssystem *in vitro* die Entzündungssituation nur unzureichend erfasst. In einer Entzündungsreaktion sind die Mastzellen, abhängig vom umgebenden Milieu, verschiedenen Stimuli ausgesetzt. Einhergehend mit Befunden, die eine C5a-vermittelte Verstärkung der IgE-abhängigen Mediatorfreisetzung zeigten[153], ist es daher naheliegend, dass C5a durch die synergistische Wirkung mit anderen, *in vivo* vorkommenden Stimuli die späteren Phasen der Mediatorfreisetzung induzieren könnte. Somit wäre C5a in der Lage, in einem proinflammatorischen Milieu *in vivo* das Maß der Mediatorfreisetzung durch Mastzellen zu amplifizieren.
Insgesamt legten meine Befunde nahe, dass Mastzellen in der initialen Phase der Entzündungsreaktion durch den Komplementfaktor C5a aktiviert und an der EBA beteiligt sein könnten.

Als weitere potenzielle Aktivatoren von Hautmastzellen, die in der Entzündungsphase der EBA vorkommen, gelten Immunkomplexe. Laut verschiedener Studien exprimieren Mastzellen den niedrig-affinen FcγRIIA (CD32)[104,151], sodass sie prinzipiell Immunkomplexe binden können. Mithilfe durchflusszytometrischer Messungen konnte auch in dieser Arbeit unter den gegebenen Kulturbedingungen eine Expression dieses aktivierenden Fcγ-Rezeptors FcγRIIA auf ruhenden Hautmastzellen ermittelt werden. Obwohl humane Hautmastzellen damit das Potenzial besitzen über Immunkomplexe aktiviert zu werden, ließ sich keine Aktivierung dieser Zellen durch immobilisierte Komplexe aus Antigen und Antikörper beobachten. Diese Ergebnisse widersprechen denen anderer Gruppen, wonach Mastzellen durch die Kreuzvernetzung des FcγRIIA zur Degranulation mit Freisetzung von β-Hexosaminidase, LTC_4 und PGD_2 stimuliert werden. Im Unterschied zu meiner Arbeit wurde die Aggregation der Rezeptoren jedoch nicht mit immobilisierten Immunkomplexen induziert, sondern entweder durch den, spezifisch gegen den FcγRIIA gerichteten, monoklonalen Antikörper IV.3[154] oder durch lösliche Immunkomplexe[155,156] vermittelt. Dadurch könnten sich die Mechanismen der Interaktion mit den Fc-Rezeptoren auf Mastzellen deutlich voneinander unterscheiden. So bindet der monoklonale Antikörper IV.3 nicht mit dem Fc-Teil sondern mit

dem Fab-Fragment die Rezeptoren. Zum einen kann dadurch der Glykosylierungsstatus des Fc-Fragments seinen wesentlichen Einfluss auf die Bindung an den Fcγ-Rezeptor (verstärkt oder vermindert die Bindungsaffinität[157]) nicht ausüben. Zum anderen besitzen IgG-Antikörper eine Gelenkregion, wodurch sie den Winkel zwischen den beiden Antigen-spezifischen Regionen von 0 bis 90° variieren können. Aufgrund dieser Eigenschaft ist die Aggregation zweier Rezeptoren über die zwei spezifischen Bindungsstellen eines Antikörpers erst möglich. Gleichzeitig werden dadurch die Rezeptoren womöglich in größere räumliche Nähe gebracht als durch zwei Antikörper, die ein multivalentes Antigen binden und über ihre Fc-Teile die Rezeptoren kreuzvernetzen. Somit würden Mastzellen durch den spezifischen monoklonalen Antikörper ein anderes Signal als über Immunkomplexe erhalten. Beim Einsatz von löslichen und damit zugänglicheren Immunkomplexen sind die gegenseitigen sterischen Hinderungen der bindenden Mastzellen nicht so groß wie bei immobilisierten Immunkomplexen. Ebenfalls ist ein höherer Anteil an Antikörpern gegenüber dem Antigen im Immunkomplex geeigneter, um mehrere FcγRIIA auf einer Mastzelle gleichzeitig zu binden und damit eine Kreuzvernetzung zu induzieren. Beide Bedingungen waren in der Arbeit von Zhao *et al.*[155] so gegeben und wahrscheinlich trug dies zur Mastzellaktivierung bei. Zusätzlich wurden in dieser Studie die kultivierten Mastzellen für bis zu drei Monate alle vier bis fünf Tage auf neue Vertiefungen aufgeteilt, wodurch eventuell eine Voraktivierung der Mastzellen stattfand, welche die Degranulation durch Immunkomplexe erleichterte.

Die fehlende Aktivierbarkeit von Mastzellen durch immobilisierte Immunkomplexe erstreckte sich auch auf Ansätze, in denen die Zellen zusätzlich mit C5a ko-stimuliert wurden. Weder ließ sich die C5a-induzierte Degranulation modulieren noch war eine Veränderung des Genexpressionsmusters nachweisbar. Obwohl dieses Ergebnis zunächst überraschend erschien, so deckt es sich mit den Befunden aus Untersuchungen zur Zytokinexpression in der experimentellen EBA in Mastzell-defizienten Mäusen *in vivo* (Abschnitt 3.2.5). Diese zeigten keine Mastzell-spezifische Regulation der untersuchten Zytokine und unterstützen damit die Erkenntnis, dass eine Regulation auf Genexpressionsebene und die damit eventuell einhergehende Sekretion von Zytokinen im Verlauf der EBA nicht stattgefunden hat.

Auch wenn nach meinen Befunden Mastzellen nicht direkt durch Immunkomplexe *in vitro* aktivierbar waren, so konnte mit der definitiven Aktivierbarkeit der Mastzellen durch den Komplementfaktor C5a ihr proinflammatorisches Potenzial in der frühen Entzündungsphase der EBA eindeutig belegt werden. Zudem könnten in der Situation *in vivo*, in der weitere

zelluläre und humorale Komponenten anwesend sind, indirekte Mechanismen die Wirkung beider Komponenten noch verstärken.

Die bereits *in vitro* nachgewiesene Kapazität von Mastzellen, in der frühen Entzündungsreaktion aktiviert zu werden, wurde mithilfe eines lokalen Transfermodells *in vivo* überprüft. Dabei wurde eine Mastzell-abhängige Ödembildung direkt an der Injektionsstelle beobachtet. Die Beteiligung von Mastzellen war durch eine massive Mastzell-Degranulation im Gewebe direkt mikroskopisch nachweisbar. Ein indirekter Hinweis auf eine Mastzellaktivierung ergab sich daraus, dass Mastzell-defiziente Tiere keine Ödeme entwickelten. Es ist daher naheliegend, dass die Freisetzung vorgeformter Mastzellmediatoren die Entstehung der Ödeme verursacht hat. Demzufolge konnte die bereits in humanen Hautmastzellen festgestellte Kapazität, in der frühen Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle zu spielen, im *in vivo*-Modell bekräftigt werden.
Die frühe Aktivierung der Mastzellen im Gewebe zeigten bereits Chen und Mitarbeiter[125] im Mausmodell. Sie konnten eine zeitliche Kinetik der Mastzell-Degranulation innerhalb weniger Stunden nach der Antikörper-Injektion detektieren, worauf eine zeitlich versetzte Infiltration neutrophiler Granulozyten folgte. Auch wenn die Aktivierung der Mastzellen keinesfalls spezifisch auf die Injektion des pathogenen Antikörpers zurückzuführen ist, sondern bereits durch die mechanische Irritation durch die Injektion vermittelt wurde, könnten Mastzellen als Mittler zwischen dem aktivierten Komplementsystem und den rekrutierten Neutrophilen in der EBA fungieren, wodurch sie eine essenzielle Rolle in der Pathogenese der Erkrankung übernehmen würden.

Die nachgewiesene Aktivierung von Mastzellen *in vivo* und ihre Aktivierbarkeit *in vitro* durch den Komplementfaktor C5a, einem in der Entzündungsreaktion essenziellen Faktor, legten zunächst eine potenzielle Beteiligung von Mastzellen in der frühen Entzündungsphase der EBA nahe.

Einfluss der Mastzellen auf die Pathogenese der experimentellen EBA

Der kausale Zusammenhang zwischen Mastzellaktivierung in der frühen Entzündungsphase der EBA und der Ausprägung der Erkrankung wurde in zwei Tiermodellen der EBA untersucht.

Im lokalen Krankheitsmodell wurde der pathogene Antikörper intradermal injiziert und verursachte eine lokale Erkrankung direkt um die Einstichstelle. Im Vergleich dazu wurde im systemischen Modell der pathogene Antikörper subkutan appliziert. Dies vermittelte ein systemisches Krankheitsbild, bei dem sich Hautläsionen über den gesamten Körper verteilt entwickeln. Beide Modelle eignen sich vor allem, um angeborene Effektormechanismen zu untersuchen. Der Vorteil des lokalen Modells ist, neben der Einsparung von Antikörper und Zeit, die Entwicklung des Phänotyps ausschließlich um die Applikationsstelle des Antikörpers. Außerdem kann mit diesem Modell vor allem die sehr frühe Phase der Entzündungsreaktion, also innerhalb der ersten 24 Stunden, untersucht werden. Durch diese schnelle und räumlich begrenzte Reaktion erlaubt das lokale Modell jedoch nicht die Erforschung systemischer Mechanismen. Damit kann dieses passive, lokale Modell nur begrenzt das systemische Modell ersetzen. Dennoch können beide Modelle sehr gut zusammen eingesetzt werden, um systemische und lokale Mechanismen zu unterscheiden.

Durch Einsatz des lokalen Krankheitsmodells der EBA konnte vor allem die frühe Entzündungsphase untersucht werden, in der eine eindeutige Aktivierung der Mastzellen beobachtet wurde. Diese Aktivierung wirkte sich jedoch lediglich auf die initiale Entzündungsreaktion aus und beschleunigte diese innerhalb der ersten 24 Stunden. Hierbei könnten die aktivierten Mastzellen neben der Ödembildung durch die Freisetzung von Lipidmediatoren und Chemokinen eine vermehrte Rekrutierung von Neutrophilen hervorrufen und durch die Sekretion von Mastzellproteasen zur Gewebezerstörung beitragen. Auf diese Weise würde der inflammatorische Prozess, der spezifisch durch die Immunkomplexe hervorgerufen wird, verstärkt werden.
Dieser kausale Zusammenhang zwischen der Anwesenheit aktivierter Mastzellen und der Ausprägung der EBA war überraschenderweise nach 48 Stunden nicht mehr nachweisbar und stellt damit die EBA-spezifische Aktivierung der Mastzellen in Frage. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch die Injektion der Isotypkontrolle oder allein des Puffers eine Mastzell-abhängige Ödembildung bewirkt und damit die Mastzellaktivierung nicht Antikörper-spezifisch sondern bereits durch die intradermale Applikation selbst hervorgerufen wird. Diese Art der Mastzellaktivierung ist möglich, da Mastzellen nicht nur über Ligand-Rezeptor-Interaktionen sondern auch durch physische Reize aktiviert werden.

So könnte der hohe Druck während der intradermalen Applikation und die damit einhergehende Irritation der Haut die Mastzellen zur Degranulation stimuliert haben.

Meine Ergebnisse legen damit einen wichtigen kritischen Punkt in dem lokalen Transfermodell offen. Sie zeigen, dass allein die Applikationsform einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung von Mastzellen haben und einen wesentlichen Unterschied zwischen dem systemischen und dem lokalen Modell der EBA darstellen kann. Die von der Spezifität der applizierten Antikörper unabhängige Aktivierung von Mastzellen schränkt nicht nur die Aussagekraft des lokalen Modells bezüglich der Beteiligung dieser Zellen im Entzündungsgeschehen ein, sondern bedeutet auch, dass andere mit diesem Modell erzielte Ergebnisse kritisch hinterfragt werden müssen.

Im Gegensatz zum lokal induzierten Krankheitsmodell verläuft das systemische Modell träger und erlaubt daher vor allem die Beobachtung der späteren Entzündungsphase der EBA und damit verzögerte und indirekte Einflüsse der Mastzellen.
Bei der Untersuchung dieser Phase der EBA zeigten die drei verwendeten Mastzell-defizienten Mausstämme deutliche Diskrepanzen untereinander. Während sich die Mastzell-defizienten Tiere der W/W-v- und Cre/iDTR-Stämme im Schweregrad der EBA nicht von den Mastzell-kompetenten Gruppen unterschieden, entwickelten die Mastzell-defizienten W-sh-Mäuse stärkere klinische Symptome als ihre Wildtyp-Kontrollen.

Diese kontroversen Befunde der beiden konstitutiv Mastzell-defizienten Stämme beruhen höchstwahrscheinlich auf Nebeneffekten der Mutationen im *c-Kit*-Gen. c-Kit ist der Rezeptor des Wachstumsfaktors SCF und essenziell für die Differenzierung und das Überleben von Mastzellen. In W/W-v-Mäusen sorgen Punktmutationen direkt im *c-Kit*-Gen für den Verlust der Transmembran- und der Tyrosinkinase-Domäne und verursachen damit die Expression eines nicht-funktionalen Rezeptors auf der Zelloberfläche.[158,159] Im Gegensatz dazu besitzt der W-sh-Stamm eine Inversionsmutation in der Promotorregion des Gens, die die Expression des Moleküls verhindert.[160–162] Bedingt durch die Mutationen in *c-Kit* sind beide Mausstämme im gesamten Körper nahezu vollständig Mastzell-defizient.[87,163] Da der Rezeptor c-Kit jedoch nicht nur essenziell für die Entwicklung von Mastzellen sondern auch an der Reifung zahlreicher anderer Immunzellen beteiligt ist[164], zeigen beide Mastzell-defizienten Stämme auch Beeinträchtigungen in der Hautpigmentierung und den beinahe vollständigen Verlust der Interstitiellen Cajal-Zellen. Zusätzlich zu weiteren unerwünschten phänotypischen Eigenschaften der beiden Stämme[117,165–168] unterscheiden sie sich

besonders in ihrer Neutrophilenzahl. Während die W/W-v-Mäuse eine Neutropenie entwickeln[169], weisen W-sh-Mäuse eine Neutrophilie auf.[170]

Der Widerspruch in den Ergebnissen der zwei konstitutiv Mastzell-defizienten Stämme, W-sh und W/W-v, im systemischen Modell der EBA reiht sich in Befunde zahlreicher anderer Studien mit diesen Mausstämmen ein. Im Tiermodell der Antikörper-induzierten rheumatoiden Arthritis (RA) waren W/W-v-Mäuse vollständig vor der Erkrankung geschützt[123,154,171,172], wohingegen W-sh-Mäuse den gleichen Phänotyp ausprägten wie ihre Wildtyp-Kontrollen.[169,173] Auch in der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (EAE), dem Tiermodell der multiplen Sklerose (MS), entwickelten W/W-v-Mäuse eine mildere Erkrankung mit späterem Ausbruch[124,174–176], während die W-sh-Mäuse einen schwereren Phänotyp zeigten als die Wildtypen.[177,178] Hier argumentieren die Autoren plausibel, dass die veränderten Neutrophilenzahlen in den Stämmen die Ausprägung dieser Neutrophilen-abhängigen Krankheiten wesentlich beeinflussten.

Auch die in dieser Arbeit verwendeten W/W-v-Mäuse zeigten eine Neutropenie im Blut, während jedoch keine erhöhten Neutrophilenzahlen in den W-sh-Tieren im Vergleich zu der Kontrollgruppe gemessen werden konnten. Diese Diskrepanz zu anderen Studien liegt höchstwahrscheinlich an den hohen Neutrophilenzahlen in der Wildtyp-Kontrolle der W-sh-Tiere. Die Ermittlung der Neutrophilen im Blut war zu Anfang nicht Gegenstand der Untersuchungen, weshalb die Daten für den W-sh-Stamm und dem entsprechenden Wildtyp als einzige nicht in den Versuchstieren sondern in zusätzlichen Mäusen außerhalb des eigentlichen Experiments ermittelt wurden. Die W-sh-Mäuse kamen direkt aus der Zucht, während die Wildtyp-Tiere aus Kontrollgruppen anderer Experimente stammten. Daher kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass die Placebo-Behandlung der Wildtyp-Tiere den Neutrophilenspiegel im Blut beeinflusst und somit die außerordentlich hohen Anteile dieser Zellen in der Kontrollgruppe verursacht hat. Diese hohen, wahrscheinlich nicht physiologischen Werte der Wildtyp-Gruppe hätten demzufolge erhöhte Neutrophilenzahlen in den W-sh-Tieren überdeckt und die Bestimmung einer Neutrophilie in den W-sh-Mäusen vereitelt. Diese These wird durch den Fakt unterstützt, dass die W-sh-Tiere im Vergleich zu den anderen Mastzell-defizienten Stämmen insgesamt deutlich höhere Neutrophilen-Werte aufwiesen. Demzufolge geben diese Daten einen Hinweis auf eine Neutrophilie in den W-sh-Tieren, die jedoch durch die Untersuchung weiterer unbehandelter Tiere bestätigt werden muss.

Neutrophile als Effektorzellen der EBA nehmen einen relevanten Einfluss auf die Ausprägung der Erkrankung und könnten daher über veränderte Anteile im Blut die

gegensätzlichen Ergebnisse in den beiden konstitutiv Mastzell-defizienten Mausstämmen hervorgerufen haben. So kann die stärkere Suszeptibilität der W-sh-Mäuse gegenüber den Wildtypen mit einer eventuellen Neutrophilie in den W-sh-Mäusen erklärt werden. Aber auch bisher nicht beschriebene Nebeneffekte der *c-Kit*-Mutation oder eine protektive Rolle der Mastzellen können den schwereren Phänotyp in den Mastzell-defizienten W-sh-Tieren hervorgerufen haben. Dahingegen kann der vergleichbare Phänotyp in den W/W-v-Mäusen und ihren Wildtyp-Kontrollen durch die fehlende Beteiligung von Mastzellen an der EBA bedingt sein oder durch den Verlust an Neutrophilen in den Mastzell-defizienten Mäusen, der die Ausprägung der EBA reduziert und damit den beobachteten, schützenden Effekt der Mastzellen in den W-sh-Tieren kompensierte.
Es wird somit deutlich, dass die verschiedenen Nebeneffekte der beiden konstitutiv Mastzell-defizienten Stämme zu widersprüchlichen Ergebnissen führen können, die schwierig zu interpretieren sind und daher keine Schlussfolgerung bezüglich der Rolle von Mastzellen in der EBA zulassen. Zur Klärung dieser Diskrepanz war es notwendig, ein Mastzell-defizientes Modell einzusetzen, in dem der Verlust der Mastzellen keine anderen wichtigen zellulären Elemente beeinträchtigt.

Der kürzlich beschriebene transgene *Mcpt5-Cre iDTR*-Mausstamm stellt solch ein Werkzeug zur Untersuchung von Mastzellen dar. Diese Mäuse weisen bis auf die gewünschte Defizienz in Bindegewebs-Mastzellen keine phänotypischen Nebeneffekte auf, was im Mechanismus der Mastzelldefizienz begründet ist. Der Verlust der Mastzellen beruht hier nicht auf einer Mutation im *c-Kit*-Gen sondern basiert auf der selektiven Expression des humanen Diphtherietoxin-Rezeptors (DTR) auf Bindegewebs-Mastzellen und auf ausschließlich deren Depletion durch die Applikation von geringen DT-Dosen.[119] Die Wiederbesiedlung der Haut mit gewebespezifischen Mastzellen benötigt mehrere Wochen. Deshalb zählt dieser Stamm auch zu den konditional Mastzell-defizienten Mausstämmen. Die genetische Veränderung der Mäuse beeinträchtigt keine anderen wichtigen zellulären Elemente und verursacht auch keine phänotypischen Nebeneffekte.[179] Das *Mcpt5-Cre*-Konstrukt wird nicht in anderen hämatopoetischen Zellen außer dem Mastzell-Kompartiment exprimiert und Mastzellen sind durch die Cre-vermittelte Genotoxizität nicht signifikant betroffen.[118] Weiterhin hat die Expression des induzierbaren DTR keinen Effekt auf die Mastzellen und aufgrund der Behandlung mit DT konnten bisher keine morphologischen Veränderungen beobachtet werden. Lediglich eine sehr geringe Menge neutralisierender Antikörper gegen DT wurde von den Mäusen produziert.[120] Besonders wichtig für die Untersuchung der EBA in diesem Stamm waren die identischen Neutrophilenzahlen im Blut der Mastzell-defizienten und -kompetenten Mäuse. Der Cre/iDTR-Stamm besitzt damit zwei wesentliche Vorteile gegenüber den zuvor betrachteten, konstitutiv Mastzell-defizienten Mäusen. Durch die

selektive und induzierbare Depletion der Mastzellen können sich einerseits die Mäuse vor dem Verlust der Mastzellen normal zum adulten Tier entwickeln und andererseits sind andere Zelllinien, insbesondere neutrophile Granulozyten, in ihrer Biologie nicht beeinträchtigt.

Es ist also für die Untersuchung von Mastzellen in Krankheitsmodellen entscheidend, welcher Mastzell-defiziente Stamm verwendet wird, da Nebeneffekte der Defizienz sich auf die Ausprägung einer Erkrankung wesentlich auswirken können. Daher sollten zukünftig Ergebnisse in einem zweiten Stamm überprüft oder die Versuche zumindest im konditionalen Cre/iDTR-Stamm durchgeführt werden. Daraus ergibt sich auch, dass bisherige Ergebnisse, die mit den beiden konstitutiv Mastzell-defizienten Mausstämmen generiert wurden, sorgfältig überdacht und durch andere Modelle neu bewertet werden müssen.

Unabhängig von der eingeführten Mutation zur Erreichung der Mastzelldefizienz scheint auch der genetische Hintergrund der drei Mausstämme Einfluss auf die Ausprägung einer Erkrankung zu nehmen. So stellt der W/W-v-Stamm eine Kreuzung aus C57BL/6 und WB dar, wohingegen die W-sh- und Cre/iDTR-Mäuse einen reinen C57BL/6-Hintergrund haben. Interessanterweise zeigten die beiden letzteren Stämme auch abweichende Schweregrade der EBA. Ihr entscheidender Unterschied besteht darin, dass die Cre/iDTR-Mäuse zwei Genkonstrukte (Cre und DTR) besitzen, die in den W-sh-Mäusen und den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen nicht vorkommen. Wurfgeschwister der Cre/iDTR-Mäuse, die kein *Cre*-Gen besaßen, entwickelten einen vergleichbaren Schweregrad der EBA wie die Wildtyp-Gruppe der W-sh-Tiere (Daten nicht gezeigt). Hieran wird deutlich, dass der genetische Hintergrund einen bedeutsamen Einfluss auf das Maß der Krankheitsausprägung nehmen kann, z.B. über den Anteil neutrophiler Granulozyten im Blut. So gehen die generell höheren Neutrophilenzahlen in den W-sh-Mäusen und ihren Wildtyp-Kontrollen mit stärkeren klinischen Symptomen der EBA einher, als sie in dem W/W-v- und Cre/iDTR-Stamm zu beobachten waren.
Somit ist es unverzichtbar, immer die entsprechenden Wildtyp-Kontrollen mitzuführen, da allein der genetische Hintergrund das Ausmaß einer Erkrankung deutlich beeinflussen kann.

Aus diesen Befunden ergibt sich, dass aufgrund seiner Vorteile gegenüber den konstitutiv Mastzell-defizienten Mausstämmen der konditional Mastzell-defiziente Cre/iDTR-Stamm glaubhaftere Ergebnisse zur Beteiligung von Mastzellen in Krankheitsmodellen liefert als die konstitutiv Mastzell-defizienten Mäuse. Diese Sichtweise wird in einer Studie zur Kontakthypersensitivität bestätigt, in der Mastzell-defiziente und -kompetente Tiere des

Cre/iDTR-Stammes vergleichbare Phänotypen entwickelten und damit Befunden zu dieser Erkrankung in den W/W-v- und W-sh-Mäusen widersprachen.[119,180]
Vor diesem Hintergrund entwickelten die DT-behandelten Cre/iDTR-Mäuse die gleiche klinische Symptomatik der EBA wie die Mastzell-kompetenten Tiere. Damit wurden die Befunde des W/W-v-Stammes bestätigt, während der beobachtete protektive Effekt der Mastzellen im W-sh-Stamm vermutlich durch bisher nicht beschriebene Nebeneffekte der *c-Kit*-Mutation oder durch die eventuelle Neutrophilie der Tiere hervorgerufen wurde.
Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Mastzellen in der späteren Entzündungsphase der EBA keine essenzielle Rolle spielen.

Die obige Schlussfolgerung lässt sich durch im Blut bestimmte Zytokinmuster untermauern. Die Serumspiegel wiesen keine Mastzell-spezifisch regulierten Zytokine auf und sind ein weiterer Hinweis für die Entbehrlichkeit der Mastzellen in der EBA. Im Gegensatz dazu konnten in allen drei Mausstämmen die Moleküle G-CSF und CXCL1 als in der EBA spezifisch regulierte Zytokine identifiziert werden. Die Hochregulation dieser beiden Faktoren ordnet sich gut in das Bild der Neutrophilen-getragenen EBA ein, da G-CSF die Reifung und Aktivierung von Granulozyten steigert, während CXCL1 als Chemotaxin für Neutrophile diese verstärkt mobilisiert.
Dass generell nur wenige Zytokine reguliert vorgefunden wurden, liegt vermutlich daran, dass die deutlichsten Veränderungen in der Peripherie, also lokal im entzündeten Gewebe, stattfanden und daher in unserem passiven, systemischen Modell kaum im Blut detektierbar waren. Für zukünftige Zytokinbestimmungen sollten daher Gewebeproben aus betroffenen Hautarealen verwendet werden. Hinzu kommt, dass Veränderungen in den Zytokinspiegeln zwischen gesunden und erkrankten Tieren vor allem in den Wildtyp-Gruppen detektierbar waren, wohingegen in den Mastzell-defizienten Gruppen zum Teil durch geringe Probenzahlen und große Streuung der Werte die Ermittlung signifikanter Unterschiede nicht möglich war. Dadurch konnte der Vergleich der Zytokinspiegel von gesunden und erkrankten Tieren vorrangig für die Wildtypen vorgenommen werden.

Trotz der oben bereits diskutierten methodischen Grenzen des Modells der lokal induzierten EBA stützen dessen Ergebnisse prinzipiell die Befunde aus dem systemischen Tiermodell. Einzig der während der ersten 24 Stunden nach Induktion der Krankheit in Mastzell-defizienten Tieren gegenüber den Kontrollen verzögert auftretende Krankheitsverlauf weist auf eine potenzielle pro-pathogene Funktion der Mastzellen hin, die jedoch unabhängig von der Spezifität des verwendeten Antikörpers ist. Bei langfristiger Beobachtung der Versuchstiere glich sich dieser Effekt allerdings wieder aus und es war kein Einfluss der Mastzelldefizienz auf den Krankheitsverlauf sichtbar. Eine essenzielle Funktion der

Mastzellen in der experimentellen EBA kann damit auch im lokalen Transfermodell ausgeschlossen werden.
Weiterhin lässt sich aus der vergleichenden Betrachtung der zwei unterschiedlichen Krankheitsmodelle der EBA und der verschiedenen Mastzell-defizienten Stämme schlussfolgern, dass für die Untersuchung von Mastzellen in der EBA das systemische Krankheitsmodell unter Verwendung des konditional Mastzell-defizienten Cre/iDTR-Stammes am besten geeignet ist.

Auf Grundlage der dargestellten Ergebnisse und ihrer Interpretation konnte überzeugend belegt werden, dass die Entzündungsreaktion in der experimentellen EBA nicht auf die Präsenz und die Aktivierung von Mastzellen angewiesen ist.

Die Beteiligung von Mastzellen im bullösen Pemphigoid

Die Rolle von Mastzellen in blasenbildenden Autoimmunerkrankungen der Haut ist bisher nur wenig untersucht worden. In dieser Gruppe von Erkrankungen wurde eine wesentliche Beteiligung von Mastzellen bisher nur in der Pathophysiologie des bullösen Pemphigoids beschrieben. In zwei Studien konnten Mitglieder der Arbeitsgruppe um Liu nachweisen, dass in einem Modell dieser Krankheit Mastzellen die essenziellen Initiatoren der gesamten Pathogenese darstellen.[125,129] Die C5a-abhängige Aktivierung dieser Zellen führt dabei zur Rekrutierung weiterer Entzündungszellen wie Makrophagen und Granulozyten, die letztendlich die vollständige Ausbildung des Krankheitsbildes vermitteln.[129,130,181]
Diese Ergebnisse stehen in klarem Widerspruch zu den Befunden der vorliegenden Arbeit. Obwohl die Pathogenese von EBA und BP durch deren Autoantigene nicht nur lokal benachbart ist, sondern auch aufgrund der Beteiligung von Komplement und Neutrophilen eng miteinander verwandt erscheint, spielen Mastzellen in experimenteller EBA und experimentellen BP offensichtlich vollständig unterschiedliche Rollen. Die Gründe für diese Unterschiede können vielfältig sein und ihre vollständige Aufklärung würde den Rahmen dieser Arbeit überschreiten. Zunächst ist es denkbar, dass an beiden Krankheiten, trotz hoher Ähnlichkeit, unterschiedliche Pathomechanismen beteiligt sind. So findet man beispielsweise im Entzündungsinfiltrat der Haut von BP-Patienten eosinophile Granulozyten[182] und in der DEJ gebundenes IgE[183], welche in der EBA nicht nachweisbar sind. Auch konnten in Mausmodellen des BP vorrangig eine Komplementaktivierung über den klassischen Weg[184] (alternativer Weg in der EBA) sowie eine essenzielle Beteiligung der Fcγ-Rezeptoren IIA und IIIB[155,185] (FcγRIV in der EBA) beobachtet werden.

Auf der anderen Seite unterscheiden sich die verwendeten Tiermodelle für die Untersuchung von Mastzellen in BP und EBA, was einen direkten Vergleich der Ergebnisse erschwert. Während ich für meine Untersuchungen adulte Tiere verschiedener Mastzell-defizienter Linien verwendet habe, wurden die Untersuchungen zur Rolle der Mastzellen im BP bisher ausschließlich im lokalen Modell und vorrangig an neonatalen Mäusen des konstitutiv Mastzell-defizienten Mausstammes *Mgf*$^{Sl/Sl\text{-}d}$ durchgeführt. Dabei waren Mastzell-defiziente Tiere immer vollständig vor einer Ausprägung des BP geschützt. Rekonstitutionsexperimente mit Mastzellen erfolgten in adulten W/W-v-Tieren, wobei die Mastzell-kompetenten Ohren lediglich eine Rötung der Haut jedoch keine Läsionen entwickelten.[125,129]

Die Interpretation dieser Ergebnisse erscheint aus mehreren Gründen schwierig. Die Verwendung von neonatalen Mäusen, insbesondere zur Untersuchung von Mastzellen, ist kritisch, da in diesen Tieren sowohl das adaptive als auch das angeborene Immunsystem noch nicht vollständig ausgereift ist. So weisen neonatale Mäuse beispielsweise eine eingeschränkte Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten auf, da diese den Chemokinrezeptor CXCR2 schwächer exprimieren als in adulten Tieren.[186] Möglicherweise wird die verringerte Migration der Neutrophilen im neonatalen Tier durch die Aktivierung von Mastzellen (nach einer intradermalen Injektion) verbessert, indem Mastzellmediatoren andere Chemokinrezeptoren ansprechen und damit erst eine ausreichende Infiltration der Neutrophilen ins Gewebe ermöglichen. Vorhandene Immunkomplexe übernehmen dann die lokale Aktivierung der Neutrophilen, wodurch es zur Ausprägung von Hautläsionen kommt.

Nach dieser These erhalten Mastzellen im neonatalen Modell eine viel höhere Bedeutung bei der Initiation des BP als im adulten Tier.

Neonatale Mastzell-defiziente Mäuse können nicht mit Mastzellen rekonstituiert werden, da nach einem Transfer die Mastzellen mehrere Wochen brauchen, um zum gewebespezifischen Phänotyp zu differenzieren. Dadurch konnte in Arbeiten von Chen *et al.*[125] nicht ausgeschlossen werden, dass in dem verwendeten Mastzell-defizienten *Mgf*$^{Sl/Sl\text{-}d}$-Stamm, in dem nicht der Rezeptor c-Kit sondern SCF selbst fehlt, Nebeneffekte des SCF-Verlusts die Mäuse vor der Ausprägung des BP schützten.

Die eingeschränkte Aussagekraft in der Verwendung neonataler Tiere wird von der Arbeitsgruppe auch selbst erbracht. So zeigte sich bei Rekonstitution adulter Mäuse des W/W-v-Stammes mit Mastzellen, dass die Immunreaktion auf den pathogenen Antikörper am rekonstituierten Ohr sehr schwach und somit der Unterschied zwischen dem Mastzell-defizienten und dem Mastzell-kompetenten Ohr nur gering war.[125] Damit ähnelt dieser Befund meinen Ergebnissen im lokalen Krankheitsmodell der EBA, die eine leichte, aber signifikante Erhöhung des Befalls in der Gegenwart von Mastzellen zeigten. Da die Beobachtung im BP nach 24 Stunden beendet wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Mastzellen auch in dieser Erkrankung eine ähnliche beschleunigende Rolle spielen wie

im lokalen Modell der EBA. Eine eindeutige Klärung der Rolle der Mastzellen ausschließlich im lokalen Transfermodell der Erkrankung unter Verwendung neonataler Tiere erscheint damit schwierig.

Vor dem Hintergrund meiner Ergebnisse, die einen relevanten Einfluss des jeweils verwendeten Mausstammes und des jeweiligen Applikationsmodells zeigen, erscheint es unklar, ob Mastzellen wirklich eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des BP einnehmen. Es wäre daher wichtig, die Relevanz von Mastzellen im experimentellen BP erneut zu untersuchen. Das systemische Modell im konditional Mastzell-defizienten Cre/iDTR-Stamm hat sich in dieser Arbeit als verlässlichstes Modell erwiesen und bietet sich für die Aufklärung der Rolle der Mastzellen im BP an. Ein solches Experiment würde außerdem zur Klärung beitragen, ob die beobachteten, gegensätzlichen Ergebnisse in distinkten Pathomechanismen von EBA und BP oder in den verschiedenen verwendeten Modellen begründet sind.

Mastzellen in der Autoimmunität – ein Ausblick

Neben dem BP wurde die Beteiligung von Mastzellen bereits mehrfach in verschiedenen anderen Autoimmunerkrankungen untersucht. Allerdings wird ihre Rolle immer noch in Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (RA) und der multiplen Sklerose (MS) anhand widersprüchlicher Ergebnisse kontrovers diskutiert. So konnten zahlreiche Studien in der EAE zeigen, dass W-sh- und W/W-v-Mäuse entweder vor der Erkrankung geschützt[124,174–176,187] oder von ihr stärker betroffen[177,178] waren. Wiederum andere Autoren fanden keinen ausgeprägten Phänotyp der Erkrankung in diesen Stämmen.[188,189] Im Gegensatz dazu wiesen die W/W-v-Tiere im Tiermodell der RA immer eine mildere Erkrankung auf als die Wildtyp-Kontrollen[123,154,169,171,172,189], während der W-sh-Stamm keine Veränderungen in der RA zeigte.[169,190]

Diese Daten beruhen vielfach auf Untersuchungen in W-sh- und W/W-v-Mäusen und verdeutlichen die Problematik in der Interpretation von Ergebnissen, welche mit diesen konstitutiv Mastzell-defizienten Stämmen erzielt wurden und zeigen den Bedarf an neuen, verlässlicheren Modellen auf. Mit den $Cpa3^{Cre/+}$-Mäusen wurde kürzlich ein weiterer konstitutiv Mastzell-defizienter Mausstamm vorgestellt, dessen Mastzelldefizienz jedoch unabhängig von Veränderungen im *c-Kit*-Gen erreicht wird. Die spezifische Überexpression der Cre-Rekombinase ausschließlich in den Mastzellen bewirkt deren Verlust ohne weitere Zellen des Immunsystems zu beeinträchtigen. Unter Verwendung dieses Stammes konnte bereits eine Reihe früherer Ergebnisse in Modellen der RA und MS erfolgreich revidiert

werden.[189] Zusammen mit dem Cre/iDTR-Stamm könnten die Cpa3$^{Cre/+}$-Mäuse geeignet sein, die vielfach noch widersprüchlichen Befunde zur Relevanz von Mastzellen in der Autoimmunität aber auch in anderen chronischen Erkrankungen zu klären. Dieser Klärungsprozess ist essenziell für die Erfolgsaussicht neuer therapeutischer Strategien in der Behandlung der Krankheiten im Menschen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich Mastzell-defiziente Stämme in Ausprägung und Verlauf einer Erkrankung wesentlich unterscheiden. Es erscheint daher ratsam, funktionelle Studien hinsichtlich der Beteiligung von Mastzellen an einem Krankheitsgeschehen in unterschiedlichen Mastzell-defizienten Stämmen zu wiederholen, präferenziell in solchen, in denen die Defizienz unabhängig von einer Mutation des *c-Kit*-Gens erzielt wird.

Unter Verwendung verschiedener Mausstämme konnte ich die Hypothese einer zentralen Bedeutung von Mastzellen in der Pathogenese der experimentellen EBA widerlegen. Trotz der Unterschiede zwischen dem menschlichen und murinen Organismus erscheint es unwahrscheinlich, dass Mastzellen als therapeutisches Ziel für die Behandlung von EBA-Patienten zukünftig in Frage kommen. Die diskrepanten Befunde zwischen EBA und BP zeigen auf, dass sich auch sehr nahe verwandte Erkrankungen in den ihnen zugrundeliegenden Pathomechanismen unterscheiden können und eine generelle Aussage über die Rolle von Mastzellen in bullösen Autoimmunerkrankungen der Haut nicht möglich ist. Konsequenterweise muss zukünftig die Rolle und Funktion dieser Zellen spezifisch und individuell für jedes Mitglied dieser Gruppe bestimmt werden.

5. Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Erkrankungen wie Allergien, Asthma, Morbus Crohn oder Autoimmunleiden weisen seit einigen Jahrzenten in der westlichen Welt einen dramatischen Anstieg auf. Viele dieser Krankheiten sind schwer behandelbar und ihre Therapien beschränken sich weitgehend auf breit wirkende immunsuppressive Verfahren. Um die damit verbundenen Belastungen der Patienten reduzieren zu können, werden gegenwärtig intensiv neue Methoden gesucht, mithilfe derer spezifisch in die Regulation des Immunsystems eingegriffen werden kann. In diesem Zusammenhang erscheinen Mastzellen als attraktive neue therapeutische Ziele. Während die zentrale Rolle von Mastzellen in der Vermittlung von allergischen Reaktionen bereits seit langer Zeit bekannt ist, befindet sich die Aufklärung ihrer Bedeutung in der Autoimmunität erst seit kurzem im Fokus intensiver Forschung. Basierend auf Beobachtungen in verschiedenen Mastzell-defizienten Mausstämmen werden Mastzellen als fundamentale Mittler in Autoimmunerkrankungen wie beispielweise der rheumatoiden Arthritis oder der multiplen Sklerose vermutet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle von Mastzellen in der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) untersucht, einer subepidermalen bullösen Autoimmundermatose, die durch Autoantikörper gegen Kollagen Typ VII charakterisiert ist. EBA-Patienten leiden an einer zum Teil großflächigen Ausbildung von Blasen an Haut und Schleimhäuten, der Bildung von Narben und Milien sowie einer Brüchigkeit der Haut. In dieser Studie an humanen Hautmastzellen *in vitro* und verschiedenen Mastzell-defizienten Mausstämmen *in vivo* sollte geklärt werden, ob und wie Mastzellen als Initiatoren und Regulatoren an der Erkrankung beteiligt sind.

Untersuchungen an isolierten humanen Hautmastzellen ergaben, dass sich in diesen Zellen durch den während der Entzündungsreaktion freigesetzten Komplementfaktor C5a, nicht jedoch durch immobilisierte Immunkomplexe, eine massive Degranulation induzieren lässt. Weiterhin führte die lokale Applikation von Antikörpern, unabhängig von deren Spezifität, zu einer direkten Aktivierung von Mastzellen in der Haut von Mäusen und zu einer von Mastzellen abhängigen Ausbildung von Ödemen. Um zu klären, ob diese Funktionen auch relevant im Krankheitsgeschehen der EBA sind, wurden im Weiteren drei verschiedene Mastzell-defiziente Mausstämme in einem systemischen Antikörper-Transfermodell der EBA untersucht. Im Gegensatz zur ursprünglichen Hypothese erwiesen sich alle Mastzell-defizienten Stämme als prinzipiell anfällig gegenüber der Erkrankung. Damit konnte erstmalig gezeigt werden, dass trotz der Vorbefunde *in vitro* und *in vivo* Mastzellen nicht für die Ausbildung des experimentellen Krankheitsbildes der EBA notwendig sind. Überraschenderweise entwickelten die verschiedenen Stämme jedoch individuelle Phänotypen hinsichtlich der Intensität und dem Verlauf der Krankheit. Während die

C57BL/6J *Kit*$^{W\text{-}sh/W\text{-}sh}$-Mäuse verglichen mit ihren Wildtyp-Kontrollen eine unerwartet erhöhte klinische Symptomatik zeigten, konnte in den WBB6F$_1$/J *Kit*$^{W/W\text{-}v}$ und *Mcpt5-Cre iDTR*-Mäusen kein Unterschied zu den entsprechenden Mastzell-kompetenten Kontrollen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu ließ sich in histologische Untersuchungen der entzündeten Haut kein qualitativer Unterschied zwischen den einzelnen Stämmen nachweisen. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der im Blut der verschiedenen Mausstämme enthaltenen neutrophilen Granulozyten lassen vermuten, dass die in C57BL/6J *Kit*$^{W\text{-}sh/W\text{-}sh}$ und WBB6F$_1$/J *Kit*$^{W/W\text{-}v}$ beobachteten Phänotypen nicht auf deren Defizienz von Mastzellen beruhen, sondern einen Seiteneffekt der in diesen Stämmen eingeführten Mutationen im *c-Kit*-Gen darstellen.
Um auch den initialen Entzündungsprozess während der ersten 48 Stunden erfassen zu können, wurde im Weiteren ein lokales Antikörper-Transfermodell der EBA verwendet. Obwohl sich die Symptome der EBA in Mastzell-defizienten Mäusen zunächst langsamer entwickelten, ließ sich dieser Effekt 48 Stunden nach Applikation des pathogenen Antikörpers nicht mehr nachweisen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass in der EBA, im Gegensatz zu anderen Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise dem nahe verwandten bullösen Pemphigoid, Mastzellen nicht zur Pathogenese der Erkrankung beitragen. Eine generelle Aussage über die Beteiligung von Mastzellen an bullösen Autoimmunerkrankungen ist damit nicht möglich und nach den hier dargestellten Befunden erscheint die Verwendung von Mastzellen als therapeutisches Ziel für die Behandlung von Patienten mit einer EBA nicht sinnvoll.
Weiterhin machen die unterschiedlichen Befunde in den drei untersuchten Mausstämmen deutlich, dass die Ausprägung der Erkrankung stark vom jeweilig verwendeten Mausstamm abhängig ist. Daher sollten Untersuchungen zur funktionellen Beteiligung von Mastzellen in entzündlichen Prozessen stets in einem zweiten Mastzell-defizienten Mausstamm überprüft werden, vorzugsweise in solchen, in denen die Defizienz unabhängig von einer Veränderung des *c-Kit*-Gens erzielt wird.

Anhang

Puffer und Medien

Das verwendete Wasser wurde mithilfe einer Ultra-Ionenaustausch-Membranfiltrationsanlage (Milli-Q Reagent Water System, Millipore, Eschborn, Deutschland) aufbereitet.

Medien	**Zusammensetzung**
CL-Medium	RPMI 1640, modifiziert (o. Phenolrot)
CL-Medium *komplett*	RPMI1640, modifiziert (o. Phenolrot) + 2,6 % Supplement (StemPro-34) + 2 mM L-Glutamin + 100 U/mL Penicillin + 100 µg/mL Streptavidin + 100 ng/mL humanes SCF
Transportmedium für humane Haut	RPMI 1640 + 10% FCS + 20 mM Hepes + 100 U/mL Penicillin + 100 µg/mL Streptavidin + 25 µg/mL Heparin
Medium für die Mastzellkultur	Stem Pro-34 (Basismedium) + 2,6% Supplement + 2 mM L-Glutamin + 100 U/mL Penicillin + 100 µg/mL Streptavidin + 100 ng/mL humanes SCF
Narkosemittel	4,313 mL 0,9% NaCl + 625 µL 10% Ketamin + 62,5 µL 2% Xylazin

Puffer	**Zusammensetzung**
Blockingpuffer (Stimulation humaner Hautmastzellen)	PBS-D + 1% BSA + 0,05% Tween-20
Lysepuffer	10 mM $KHCO_3$ 155 mM NH_4Cl 300 µM EDTA
Mastzellpuffer	0,14 M NaCl 5,6 mM Glukose 12 mM Hepes 2,7 mM KCl 3,8 mM Na_3PO_4 x 12 H_2O 0,1% BSA, in Aqua dest gelöst
Natriumcitratpuffer	0,13 M $C_6H_5Na_3O_7$ x 2 H_2O
PBS	10 mM NaH_2PO_4 0,15 M NaCl pH 7,2
PBS-Dulbecco (PBS-D)	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na_2HPO_4, gelöst in Aqua dest 1,5 mM KH_2PO_4 pH 7,2 – 7,3
PBS-Dulbecco m. Ca, Mg	PBS-Dulbecco + 0,9 mM $CaCl_2$ x 2 H_2O + 0,5 mM $MgCl_2$ x 6 H_2O pH 7,2 – 7,3
PBS-Azid	PBS + 15 mM NaN_3
Toluidinblau	0,2 % Toluidinblau, in 1 M HCl gelöst
Trypanblau	0,9 % NaCl 0,5 % Trypanblau, in H_2O gelöst

Chemotaxis von Neutrophilen

	Zusammensetzung
Blockingpuffer	0,1 M $NaHCO_3$-Lösung mit 0,1 M Na_2CO_3-Lösung auf pH 9,0 eingestellt
Ethanolische Natronlauge	1 M NaOH in 50% EtOH
Phosphatpuffer	0,1 M Na_2HPO_4 x 2 H_2O pH 7

Bestimmung der β-Hexosaminidase aus Mastzellen

	Zusammensetzung
Substratpuffer	50 mM Zitronensäure ($C_6H_8O_7$) 50 mM Natriumcitrat ($C_6H_5Na_3O_7$ x 2 H_2O) pH 4,5
Substratlösung	Substratpuffer + 4 mM 4-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide ($C_{14}H_{18}N_2O_8$)
Stopplösung	0,217 M Glycin 0,216 M NaCl pH 10,45

Nachweis der Myeloperoxidase (MPO)

	Zusammensetzung
Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat	200 mM TMB in 10 mL Aceton ad 100 mL mit EtOH + 600 µL 30% H_2O_2
Substratlösung	50 µL TMB-Substrat/mL Substratpuffer
Substratpuffer	33 mM $C_6H_8O_7$ pH 4,1

Liste der verändert exprimierten Gene in humanen Mastzellen

Tabelle A.1: Verändert exprimierte Gene in anti-IgE-stimulierten humanen Hautmastzellen[1]

Probe set	Gen-symbol	Gen-Name	CL	a-IgE	Faktor
7900365	MFSD2	major facilitator superfamily domain containing 2	29.61	137.53	**4.65**
7902861	LRRC8B	leucine rich repeat containing 8 family, memberB	69.18	377.6	**5.46**
7903786	CSF1	colony stimulating factor 1 (macrophage)	66.15	1010.04	**15.27**
7906244	NTRK1	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1	64.08	475.63	**7.42**
7908161	C1orf21	chromosome 1 open reading frame 21	82.36	276.32	**3.36**
7908917	BTG2	BTG family, member 2	56.54	320.89	**5.68**
7912145	TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	53.2	503.14	**9.46**
7922343	TNFSF4	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4	18.99	197.67	**10.41**
7922610	ABL2	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2 (arg, Abelson-related gene)	54.68	195.31	**3.57**
7922976	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	176.24	1731	**9.82**
7925257	LYST	lysosomal trafficking regulator	267.8	97.46	**-2.75**
7935188	SORBS1	sorbin and SH3 domain containing 1	79.86	247.62	**3.1**
7943413	BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3	182.72	756.46	**4.14**
7948667	AHNAK	AHNAK nucleoprotein	289.54	125.56	**-2.31**
7949754	CLCF1	cardiotrophin-like cytokine factor 1	18.04	143.31	**7.94**
7950473	ARRB1	arrestin, beta 1	223.36	53.21	**-4.2**
7955290	AQP2	aquaporin 2 (collecting duct)	19.28	467.63	**24.25**
7955589	NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	36.03	151.88	**4.22**
7970602	PARP4	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 4	285.88	90.43	**-3.16**
7978366	GZMB	granzyme B	33.43	602.16	**18.01**
7990632	SGK269	NKF3 kinase family member	65.96	187.33	**2.84**
8004671	JMJD3	jumonji domain containing 3, histone lysine demethylase	64.65	213.16	**3.3**
8006433	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	354.64	2156.88	**6.08**
8006531	SLFN5	schlafen family member 5	224.19	58.53	**-3.83**
8006602	CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	8	274.7	**34.32**
8006608	CCL4L1	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 1	12.35	844.41	**68.4**
8006621	CCL4L1	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 1	13.43	993.93	**73.98**
8014160	CCL1	chemokine (C-C motif) ligand 1	50.25	1605.47	**31.95**
8014369	CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3	10.09	130.76	**12.96**
8014391	CCL3L1	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1	13.78	158.35	**11.49**
8014414	CCL3L1	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1	13.78	158.35	**11.49**
8019651	CCL4L1	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 1	13.43	993.93	**73.98**
8019731	CCL3L1	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1	13.78	158.35	**11.49**
8021301	RAB27B	RAB27B, member RAS oncogene family	526.8	127.94	**-4.12**
8025402	ANGPTL4	angiopoietin-like 4	9.36	120.83	**12.9**
8026468	CYP4F12	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 12	23.67	201.02	**8.49**
8041048	FOSL2	FOS-like antigen 2	99.96	314.34	**3.14**
8046124	DHRS9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	22.98	127.21	**5.54**

Probe set	Gen-symbol	Gen-Name	CL	a-IgE	Faktor
8047738	NRP2	neuropilin 2	24	129.88	**5.41**
8047763			22.94	135.62	**5.91**
8051814	ZFP36L2	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	244.27	97.8	**-2.5**
8055952	NR4A2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	36.35	470.93	**12.95**
8057797	SDPR	serum deprivation response (phosphatidylserine binding protein)	39.46	162.15	**4.11**
8059376	SERPINE2	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2	40.1	171.27	**4.27**
8064790	RASSF2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2	252.81	87.51	**-2.89**
8072798	CYTH4	cytohesin 4	173.67	68.69	**-2.53**
8080938	MITF	microphthalmia-associated transcription factor	105.64	240.16	**2.27**
8086341	XIRP1	xin actin-binding repeat containing 1	8.77	117.67	**13.42**
8090469	GATA2	GATA binding protein 2	245.31	86.67	**-2.83**
8093976	TBC1D14	TBC1 domain family, member 14	200.83	58.93	**-3.41**
8098195	SC4MOL	sterol-C4-methyl oxidase-like	249.55	732.88	**2.94**
8107878	IL3	interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)	6.99	229.86	**32.87**
8107887	CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	48.6	959.18	**19.74**
8108378	CTNNA1	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1	109.24	310.57	**2.84**
8111941	HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	103.95	350.71	**3.37**
8113214	GLRX	glutaredoxin (thioltransferase)	162.59	36.83	**-4.41**
8113790	MARCH3	membrane-associated ring finger (C3HC4) 3	297.71	852.25	**2.86**
8116983	CD83	CD83 molecule	50.9	186.56	**3.66**
8116998	JARID2	jumonji, AT rich interactive domain 2	144.17	400.16	**2.78**
8118142	TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	19.19	133	**6.93**
8123936	NEDD9	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	28.66	196.44	**6.86**
8129458	ARHGAP18	Rho GTPase activating protein 18	291.6	97.75	**-2.98**
8139207	INHBA	inhibin, beta A	8.19	141.89	**17.32**
8140463	FGL2	fibrinogen-like 2	20.75	481.85	**23.22**
8142270	NRCAM	neuronal cell adhesion molecule	71.91	197.69	**2.75**
8156848	NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	60.46	505.71	**8.36**
8160297	ADFP	adipose differentiation-related protein	405.16	138.11	**-2.93**
8179263	TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	19.19	133	**6.93**

[1] Humane Hautmastzellen wurden über die Kreuzvernetzung ihrer IgE-Rezeptoren für vier Stunden stimuliert und ihr Genexpressionsmuster anschließend mithilfe von Affymetrix Microarrays bestimmt. Beim Vergleich mit dem Expressionsmuster unstimulierter Hautmastzellen konnten 68 Gene mit einer stark veränderten Expression identifiziert werden. Angegeben sind die gemittelten Expressionswerte der unstimulierten (CL) und mit anti-IgE stimulierten (anti-IgE) Ansätze aus drei Mastzell-Präparationen und das Verhältnis der Expressionswerte beider Ansätze (Faktor).

Aktivierung der Mastzellen im lokalen Modell der EBA

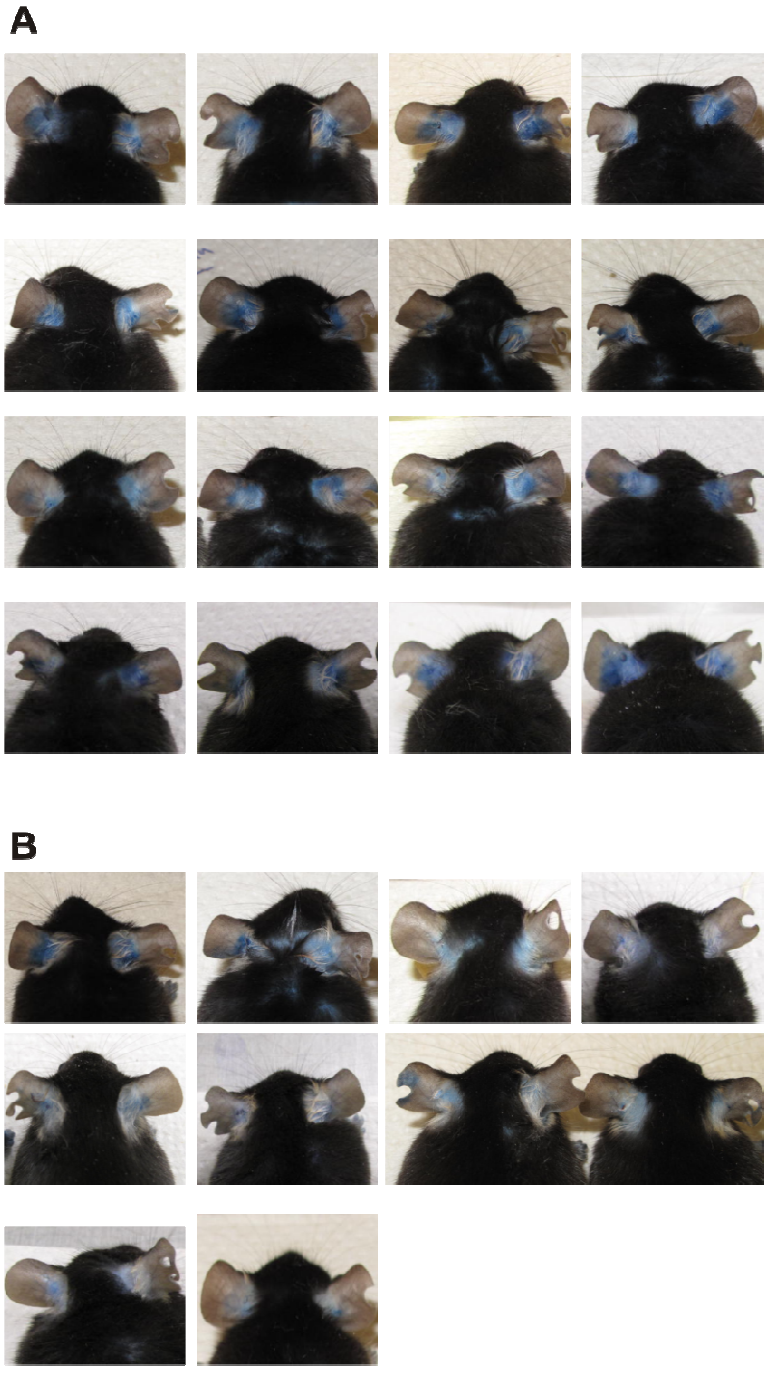


Abbildung A.1: Extravasation des Farbstoffes Evans Blue nach intradermaler Injektion
Doppelt transgene Cre/iDTR-Mäuse wurden entweder mit PBS (**A**) oder DT (**B**) vorbehandelt und erhielten nachfolgend 1% Evans Blue in die Schwanzvene injiziert. Anschließend erfolgte die intradermale Administration des pathogenen amCOL7-IgG in die linke und des irrelevanten Isotyps in die rechte Ohrbasis. Die Fotos zeigen alle im Versuch enthaltenen Mäuse vor und zehn Minuten nach der Antikörper-Injektion.

Literaturverzeichnis

1. Junqueira, L. C. U., Carneiro, J. & Gratzl, M. in *Histologie* 307–313 (Springer Medizin Verlag, 2005).
2. Abrahamson, D. R. Recent studies on the structure and pathology of basement membranes. *J. Pathol.* **149,** 257–278 (1986).
3. https://secure3.convio.net/ccssk/site/SPageServer?pagename=men_skin. abgerufen am 18.03.2013.
4. Amagai, M., Klaus-Kovtun, V. & Stanley, J. R. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* **67,** 869–877 (1991).
5. Yokoyama, T. & Amagai, M. Immune dysregulation of pemphigus in humans and mice. *J. Dermatol.* **37,** 205–213 (2010).
6. Hashimoto, T. Skin diseases related to abnormality in desmosomes and hemidesmosomes--editorial review. *J. Dermatol. Sci.* **20,** 81–84 (1999).
7. Elliot, G. Two cases of epidermolysis bullosa. *J. Cutan. Genitourin. Dis.* **13,** 10–18 (1895).
8. Stanley, J. R., Hawley-Nelson, P., Yuspa, S. H., Shevach, E. M. & Katz, S. I. Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell* **24,** 897–903 (1981).
9. Mayuzumi, M. *et al.* Childhood epidermolysis bullosa acquisita with autoantibodies against the noncollagenous 1 and 2 domains of type VII collagen: case report and review of the literature. *Br. J. Dermatol.* **155,** 1048–1052 (2006).
10. Bordier-Lamy, F. *et al.* Épidermolyse bulleuse acquise de l'enfant. *Ann. Dermatol. Vénéréologie* **136,** 513–517 (2009).
11. Yang, B. *et al.* Childhood epidermolysis bullosa acquisita: report of a Chinese case. *Pediatr. Dermatol.* **29,** 614–617 (2012).
12. Hashimoto, T., Ishii, N., Ohata, C. & Furumura, M. Pathogenesis of epidermolysis bullosa acquisita, an autoimmune subepidermal bullous disease. *J. Pathol.* **228,** 1–7 (2012).
13. Kim, S., Kim, J. & Kim, Y. Epidermolysis Bullosa Acquisita: A Retrospective Clinical Analysis of 30 Cases. *Acta Derm. Venereol.* **91,** 307–312 (2011).
14. Gammon, W. R. *et al.* Increased frequency of HLA-DR2 in patients with autoantibodies to epidermolysis bullosa acquisita antigen: evidence that the expression of autoimmunity to type VII collagen is HLA class II allele associated. *J. Invest. Dermatol.* **91,** 228–232 (1988).
15. Lee, C. W., Kim, S. C. & Han, H. Distribution of HLA class II alleles in Korean patients with epidermolysis bullosa acquisita. *Dermatol. Basel Switz.* **193,** 328–329 (1996).
16. Zumelzu, C. *et al.* Black Patients of African Descent and HLA-DRB1*15:03 Frequency Overrepresented in Epidermolysis Bullosa Acquisita. *J. Invest. Dermatol.* **131,** 2386–2393 (2011).
17. Roenigk, H. H., Jr, Ryan, J. G. & Bergfeld, W. F. Epidermolysis bullosa acquisita. Report of three cases and review of all published cases. *Arch. Dermatol.* **103,** 1–10 (1971).
18. Ishii, N. *et al.* Epidermolysis bullosa acquisita: what's new? *J. Dermatol.* **37,** 220–230 (2010).

19. Gammon, W. R., Briggaman, R. A. & Wheeler Jr., C. E. Epidermolysis bullosa acquisita presenting as an inflammatory bullous disease. *J. Am. Acad. Dermatol.* **7,** 382–387 (1982).
20. Parente, M. G. *et al.* Human type VII collagen: cDNA cloning and chromosomal mapping of the gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88,** 6931–6935 (1991).
21. Bentz, H. *et al.* Isolation and partial characterization of a new human collagen with an extended triple-helical structural domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80,** 3168–3172 (1983).
22. Burgeson, R. E. *et al.* The Structure and Function of Type VII Collagen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **580,** 32–43 (1990).
23. Christiano, A. M. *et al.* The large non-collagenous domain (NC-1) of type VII collagen is amino-terminal and chimeric. Homology to cartilage matrix protein, the type III domains of fibronectin and the A domains of von Willebrand factor. *Hum. Mol. Genet.* **1,** 475–481 (1992).
24. Bruckner-Tuderman, L. Can Type VII Collagen Injections Cure Dystrophic Epidermolysis Bullosa? *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **17,** 6–7 (2009).
25. Morris, N. P., Keene, D. R., Glanville, R. W., Bentz, H. & Burgeson, R. E. The tissue form of type VII collagen is an antiparallel dimer. *J. Biol. Chem.* **261,** 5638–5644 (1986).
26. Sakai, L. Y., Keene, D. R., Morris, N. P. & Burgeson, R. E. Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J. Cell Biol.* **103,** 1577–1586 (1986).
27. Uitto, J., Chung-Honet, L. C. & Christiano, A. M. Molecular biology and pathology of type VII collagen. *Exp. Dermatol.* **1,** 2–11 (1992).
28. Woodley, D. T. *et al.* Identification of the skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. *N. Engl. J. Med.* **310,** 1007–1013 (1984).
29. Wetzels, R. H. *et al.* Distribution patterns of type VII collagen in normal and malignant human tissues. *Am. J. Pathol.* **139,** 451–459 (1991).
30. Keene, D. R., Sakai, L. Y., Lunstrum, G. P., Morris, N. P. & Burgeson, R. E. Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J. Cell Biol.* **104,** 611–621 (1987).
31. Woodley, D. T. *et al.* Epidermolysis bullosa acquisita antigen is the globular carboxyl terminus of type VII procollagen. *J. Clin. Invest.* **81,** 683–687 (1988).
32. Lapiere, J. C. *et al.* Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. *J. Clin. Invest.* **92,** 1831–1839 (1993).
33. Wegener, H., Leineweber, S. & Seeger, K. The vWFA2 domain of type VII collagen is responsible for collagen binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **430,** 449–453 (2013).
34. Tanaka, H. *et al.* A novel variant of acquired epidermolysis bullosa with autoantibodies against the central triple-helical domain of type VII collagen. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **77,** 623–632 (1997).
35. Chen, M., Keene, D. R., Costa, F. K., Tahk, S. H. & Woodley, D. T. The carboxyl terminus of type VII collagen mediates antiparallel dimer formation and constitutes a new antigenic epitope for epidermolysis Bullosa acquisita autoantibodies. *J. Biol. Chem.* **276,** 21649–21655 (2001).

36. Ishii, N. *et al.* Epidermolysis bullosa acquisita sera react with distinct epitopes on the NC1 and NC2 domains of type VII collagen: study using immunoblotting of domain-specific recombinant proteins and postembedding immunoelectron microscopy. *Br. J. Dermatol.* **150,** 843–851 (2004).
37. Ishii, N. *et al.* Some epidermolysis bullosa acquisita sera react with epitopes within the triple-helical collagenous domain as indicated by immunoelectron microscopy. *Br. J. Dermatol.* **160,** 1090–1093 (2009).
38. Yaoita, H., Briggaman, R. A., Lawley, T. J., Provost, T. T. & Katz, S. I. Epidermolysis bullosa acquisita: ultrastructural and immunological studies. *J. Invest. Dermatol.* **76,** 288–292 (1981).
39. Fine, J. D., Tyring, S. & Gammon, W. R. The presence of intra-lamina lucida blister formation in epidermolysis bullosa acquisita: possible role of leukocytes. *J. Invest. Dermatol.* **92,** 27–32 (1989).
40. Gammon, W. R., Briggaman, R. A., Inman, A. O., 3rd, Queen, L. L. & Wheeler, C. E. Differentiating anti-lamina lucida and anti-sublamina densa anti-BMZ antibodies by indirect immunofluorescence on 1.0 M sodium chloride-separated skin. *J. Invest. Dermatol.* **82,** 139–144 (1984).
41. Komorowski, L. *et al.* Sensitive and specific assays for routine serological diagnosis of epidermolysis bullosa acquisita. *J. Am. Acad. Dermatol.* **68,** e89–95 (2013).
42. Saleh, M. A. *et al.* Development of NC1 and NC2 domains of type VII collagen ELISA for the diagnosis and analysis of the time course of epidermolysis bullosa acquisita patients. *J. Dermatol. Sci.* **62,** 169–175 (2011).
43. Kim, J. & Kim, S.-C. Epidermolysis bullosa acquisita. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* (2013). doi:10.1111/jdv.12096
44. Marzano, A. V. *et al.* Diagnosis and disease severity assessment of epidermolysis bullosa acquisita by ELISA for anti-type VII collagen autoantibodies: an Italian multicentre study. *Br. J. Dermatol.* **168,** 80–84 (2013).
45. Kim, J. h. *et al.* Serum levels of anti-type VII collagen antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay in patients with epidermolysis bullosa acquisita are correlated with the severity of skin lesions. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* (2012). doi:10.1111/j.1468-3083.2012.04617.x
46. Engineer, L. & Ahmed, A. R. Emerging treatment for epidermolysis bullosa acquisita. *J. Am. Acad. Dermatol.* **44,** 818–828 (2001).
47. Mutasim, D. F. Management of autoimmune bullous diseases: pharmacology and therapeutics. *J. Am. Acad. Dermatol.* **51,** 859–877; quiz 878–880 (2004).
48. Gürcan, H. M. & Ahmed, A. R. Current concepts in the treatment of epidermolysis bullosa acquisita. *Expert Opin. Pharmacother.* **12,** 1259–1268 (2011).
49. Cunningham, B. B., Kirchmann, T. T. & Woodley, D. Colchicine for epidermolysis bullosa acquisita. *J. Am. Acad. Dermatol.* **34,** 781–784 (1996).
50. Bibas, R., Gaspar, N. K. & Ramos-e-Silva, M. Colchicine for dermatologic diseases. *J. Drugs Dermatol.* **4,** 196–204 (2005).

51. Gürcan, H. M. & Ahmed, A. R. Efficacy of Dapsone in the Treatment of Pemphigus and Pemphigoid. *Am. J. Clin. Dermatol.* **10,** 383–396 (2009).
52. Campos, M., Silvente, C., Lecona, M., Suárez, R. & Lázaro, P. Epidermolysis bullosa acquisita: diagnosis by fluorescence overlay antigen mapping and clinical response to high-dose intravenous immunoglobulin. *Clin. Exp. Dermatol.* **31,** 71–73 (2006).
53. Gourgiotou, K. *et al.* Epidermolysis bullosa acquisita: treatment with intravenous immunoglobulins. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. Jeadv* **16,** 77–80 (2002).
54. Sadler, E. *et al.* Treatment-resistant classical epidermolysis bullosa acquisita responding to rituximab. *Br. J. Dermatol.* **157,** 417–419 (2007).
55. Schmidt, E., Benoit, S., Bröcker, E.-B., Zillikens, D. & Goebeler, M. Successful adjuvant treatment of recalcitrant epidermolysis bullosa acquisita with anti-CD20 antibody rituximab. *Arch. Dermatol.* **142,** 147–150 (2006).
56. Kim, J. H., Lee, S. E. & Kim, S.-C. Successful treatment of epidermolysis bullosa acquisita with rituximab therapy. *J. Dermatol.* **39,** 477–479 (2012).
57. Schmidt, E., Goebeler, M. & Zillikens, D. Rituximab in severe pemphigus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1173,** 683–691 (2009).
58. Boross, P. & Leusen, J. H. W. Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am. J. Cancer Res.* **2,** 676–690 (2012).
59. Schmidt, E. & Zillikens, D. Immunoadsorption in dermatology. *Arch. Dermatol. Res.* **302,** 241–253 (2010).
60. Woodley, D. T. *et al.* Evidence that anti-type VII collagen antibodies are pathogenic and responsible for the clinical, histological, and immunological features of epidermolysis bullosa acquisita. *J. Invest. Dermatol.* **124,** 958–964 (2005).
61. Sitaru, C. *et al.* Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *J. Clin. Invest.* **115,** 870–878 (2005).
62. Sitaru, C. *et al.* Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177,** 3461–3468 (2006).
63. Sitaru, C. Experimental models of epidermolysis bullosa acquisita. *Exp. Dermatol.* **16,** 520–531 (2007).
64. Bieber, K. *et al.* Animal models for autoimmune bullous dermatoses. *Exp. Dermatol.* **19,** 2–11 (2010).
65. Ludwig, R. J. Model systems duplicating epidermolysis bullosa acquisita: a methodological review. *Autoimmunity* **45,** 102–110 (2012).
66. Woodley, D. T. *et al.* Induction of epidermolysis bullosa acquisita in mice by passive transfer of autoantibodies from patients. *J. Invest. Dermatol.* **126,** 1323–1330 (2006).
67. Ludwig, R. J. *et al.* Generation of antibodies of distinct subclasses and specificity is linked to H2s in an active mouse model of epidermolysis bullosa acquisita. *J. Invest. Dermatol.* **131,** 167–176 (2011).
68. Müller, R. *et al.* T and B cells target identical regions of the non-collagenous domain 1 of type VII collagen in epidermolysis bullosa acquisita. *Clin. Immunol.* **135,** 99–107 (2010).

69. Sitaru, A. G. *et al.* T cells are required for the production of blister-inducing autoantibodies in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184,** 1596–1603 (2010).
70. Kasperkiewicz, M. *et al.* Heat-shock protein 90 inhibition in autoimmunity to type VII collagen: evidence that nonmalignant plasma cells are not therapeutic targets. *Blood* **117,** 6135–6142 (2011).
71. Bernard, P. *et al.* The subclass distribution of IgG autoantibodies in cicatricial pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. *J. Invest. Dermatol.* **97,** 259–263 (1991).
72. Cho, H. J., Lee, I. J. & Kim, S. C. Complement-fixing abilities and IgG subclasses of autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita. *Yonsei Med. J.* **39,** 339–344 (1998).
73. Gandhi, K. *et al.* Autoantibodies to type VII collagen have heterogeneous subclass and light chain compositions and their complement-activating capacities do not correlate with the inflammatory clinical phenotype. *J. Clin. Immunol.* **20,** 416–423 (2000).
74. Recke, A. *et al.* Pathogenicity of IgG subclass autoantibodies to type VII collagen: induction of dermal-epidermal separation. *J. Autoimmun.* **34,** 435–444 (2010).
75. Mihai, S. *et al.* The alternative pathway of complement activation is critical for blister induction in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178,** 6514–6521 (2007).
76. Guo, R.-F. & Ward, P. A. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu. Rev. Immunol.* **23,** 821–852 (2005).
77. Woodley, D. T., Briggaman, R. A. & Gammon, W. R. Acquired epidermolysis bullosa. A bullous disease associated with autoimmunity to type VII (anchoring fibril) collagen. *Dermatol. Clin.* **8,** 717–726 (1990).
78. Sitaru, C., Kromminga, A., Hashimoto, T., Bröcker, E. B. & Zillikens, D. Autoantibodies to type VII collagen mediate Fcgamma-dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *Am. J. Pathol.* **161,** 301–311 (2002).
79. Kasperkiewicz, M. *et al.* Genetic identification and functional validation of FcγRIV as key molecule in autoantibody-induced tissue injury. *J. Pathol.* (2012). doi:10.1002/path.4023
80. Hammers, C. M. *et al.* Complement-fixing anti-type VII collagen antibodies are induced in Th1-polarized lymph nodes of epidermolysis bullosa acquisita-susceptible mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187,** 5043–5050 (2011).
81. Karsten, C. M. & Köhl, J. The immunoglobulin, IgG Fc receptor and complement triangle in autoimmune diseases. *Immunobiology* **217,** 1067–1079 (2012).
82. Karsten, C. M. *et al.* Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nat. Med.* (2012). doi:10.1038/nm.2862
83. Allhorn, M., Olin, A. I., Nimmerjahn, F. & Collin, M. Human IgG/FcgR interactions are modulated by streptococcal IgG glycan hydrolysis. *Plos One* **3,** (2008).
84. Shimanovich, I. *et al.* Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *J. Pathol.* **204,** 519–527 (2004).

85. Chiriac, M. T. *et al.* NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *J. Pathol.* **212,** 56–65 (2007).
86. Ehrlich, P. Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Arch Mikr Anat* 263–278 (1877).
87. Kitamura, Y., Go, S. & Hatanaka, K. Decrease of mast cells in W/Wv mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood* **52,** 447–452 (1978).
88. Kirshenbaum, A. S., Kessler, S. W., Goff, J. P. & Metcalfe, D. D. Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **146,** 1410–1415 (1991).
89. Okayama, Y. & Kawakami, T. Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol. Res.* **34,** 97–115 (2006).
90. Mekori, Y. A. & Metcalfe, D. D. Mast cells in innate immunity. *Immunol. Rev.* **173,** 131–140 (2000).
91. Galli, S. J. Mast cells and basophils. *Curr. Opin. Hematol.* **7,** 32–39 (2000).
92. Metcalfe, D. D., Baram, D. & Mekori, Y. A. Mast cells. *Physiol. Rev.* **77,** 1033–1079 (1997).
93. Galli, S. J. *et al.* Mast cells as 'tunable' effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.* **23,** 749–786 (2005).
94. Weber, A., Knop, J. & Maurer, M. Pattern analysis of human cutaneous mast cell populations by total body surface mapping. *Br. J. Dermatol.* **148,** 224–228 (2003).
95. Galli, S. J., Grimbaldeston, M. & Tsai, M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8,** 478–486 (2008).
96. Kneilling, M. & Röcken, M. Mast cells: novel clinical perspectives from recent insights. *Exp. Dermatol.* **18,** 488–496 (2009).
97. Pejler, G., Rönnberg, E., Waern, I. & Wernersson, S. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood* **115,** 4981–4990 (2010).
98. Younan, G. *et al.* The inflammatory response after an epidermal burn depends on the activities of mouse mast cell proteases 4 and 5. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185,** 7681–7690 (2010).
99. Schechter, N. M. *et al.* Identification of a cathepsin G-like proteinase in the MCTC type of human mast cell. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **145,** 2652–2661 (1990).
100. Bischoff, S. C. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat. Rev. Immunol.* **7,** 93–104 (2007).
101. Malbec, O. & Daëron, M. The mast cell IgG receptors and their roles in tissue inflammation. *Immunol. Rev.* **217,** 206–221 (2007).
102. Metz, M. *et al.* Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol. Rev.* **217,** 304–328 (2007).
103. Frossi, B., Gri, G., Tripodo, C. & Pucillo, C. Exploring a regulatory role for mast cells: 'MCregs'? *Trends Immunol.* **31,** 97–102 (2010).
104. Okayama, Y. Mast cell-derived cytokine expression induced via Fc receptors and Toll-like receptors. *Chem. Immunol. Allergy* **87,** 101–110 (2005).

105. Eller, K. *et al.* IL-9 production by regulatory T cells recruits mast cells that are essential for regulatory T cell-induced immune suppression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186,** 83–91 (2011).
106. Mitsui, H. *et al.* Development of human mast cells from umbilical cord blood cells by recombinant human and murine c-kit ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90,** 735–739 (1993).
107. Meininger, C. J. *et al.* The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. *Blood* **79,** 958–963 (1992).
108. el-Lati, S. G., Dahinden, C. A. & Church, M. K. Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. *J. Invest. Dermatol.* **102,** 803–806 (1994).
109. Maurer, M. *et al.* Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature* **432,** 512–516 (2004).
110. Cormier, S. M. Physalia venom mediates histamine release from mast cells. *J. Exp. Zool.* **218,** 117–120 (1981).
111. Gordon, J. R. & Galli, S. J. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-α/cachectin. *Nature* **346,** 274–276 (1990).
112. Gibbs, B. F. *et al.* Human skin mast cells rapidly release preformed and newly generated TNF-α and IL-8 following stimulation with anti-IgE and other secretagogues. *Exp. Dermatol.* **10,** 312–320 (2001).
113. De Vries, V. C. & Noelle, R. J. Mast cell mediators in tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* **22,** 643–648 (2010).
114. Boyce, J. A. Eicosanoid mediators of mast cells: receptors, regulation of synthesis, and pathobiologic implications. *Chem. Immunol. Allergy* **87,** 59–79 (2005).
115. Sayed, B. A., Christy, A., Quirion, M. R. & Brown, M. A. The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* **26,** 705–739 (2008).
116. Lin, A. M. *et al.* Mast Cells and Neutrophils Release IL-17 Through Extracellular Trap Formation in Psoriasis. *J. Immunol.* **187,** 490–500 (2011).
117. Grimbaldeston, M. A. *et al.* Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am. J. Pathol.* **167,** 835–848 (2005).
118. Scholten, J. *et al.* Mast cell-specific Cre/loxP-mediated recombination in vivo. *Transgenic Res.* **17,** 307–315 (2008).
119. Dudeck, A. *et al.* Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. *Immunity* **34,** 973–984 (2011).
120. Buch, T. *et al.* A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat. Methods* **2,** 419–426 (2005).
121. Oldford, S. A. *et al.* A critical role for mast cells and mast cell-derived IL-6 in TLR2-mediated inhibition of tumor growth. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185,** 7067–7076 (2010).
122. Kambe, N., Kambe, M., Kochan, J. P. & Schwartz, L. B. Human skin–derived mast cells can proliferate while retaining their characteristic functional and protease phenotypes. *Blood* **97,** 2045–2052 (2001).

123. Lee, D. M. *et al.* Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* **297,** 1689–1692 (2002).
124. Secor, V. H., Secor, W. E., Gutekunst, C.-A. & Brown, M. A. Mast Cells Are Essential for Early Onset and Severe Disease in a Murine Model of Multiple Sclerosis. *J. Exp. Med.* **191,** 813–822 (2000).
125. Chen, R. *et al.* Mast cells play a key role in neutrophil recruitment in experimental bullous pemphigoid. *J. Clin. Invest.* **108,** 1151–1158 (2001).
126. Walker, M. E., Hatfield, J. K. & Brown, M. A. New insights into the role of mast cells in autoimmunity: evidence for a common mechanism of action? *Biochim. Biophys. Acta* **1822,** 57–65 (2012).
127. Benoist, C. & Mathis, D. Mast cells in autoimmune disease. *Nature* **420,** 875–878 (2002).
128. Brown, M. A. Mast cells are important modifiers of autoimmune disease: with so much evidence, why is there still controversy? *Front. Inflamm.* **3,** 147 (2012).
129. Chen, R. *et al.* Macrophages, but not T and B lymphocytes, are critical for subepidermal blister formation in experimental bullous pemphigoid: macrophage-mediated neutrophil infiltration depends on mast cell activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169,** 3987–3992 (2002).
130. Heimbach, L. *et al.* The C5a receptor on mast cells is critical for the autoimmune skin-blistering disease bullous pemphigoid. *J. Biol. Chem.* **286,** 15003–15009 (2011).
131. Lin, L. *et al.* Dual targets for mouse mast cell protease-4 in mediating tissue damage in experimental bullous pemphigoid. *J. Biol. Chem.* **286,** 37358–37367 (2011).
132. Schiemann, F. *et al.* Mast cells and neutrophils proteolytically activate chemokine precursor CTAP-III and are subject to counterregulation by PF-4 through inhibition of chymase and cathepsin G. *Blood* **107,** 2234–2242 (2006).
133. Kasper, B., Thole, H. H., Patterson, S. D. & Welte, K. Cytosolic proteins from neutrophilic granulocytes: a comparison between patients with severe chronic neutropenia and healthy donors. *Electrophoresis* **18,** 142–149 (1997).
134. Schwartz, L. B., Austen, K. F. & Wasserman, S. I. Immunologic release of beta-hexosaminidase and beta-glucuronidase from purified rat serosal mast cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **123,** 1445–1450 (1979).
135. Ludwig, A., Schiemann, F., Mentlein, R., Lindner, B. & Brandt, E. Dipeptidyl peptidase IV (CD26) on T cells cleaves the CXC chemokine CXCL11 (I-TAC) and abolishes the stimulating but not the desensitizing potential of the chemokine. *J. Leukoc. Biol.* **72,** 183–191 (2002).
136. Creamer, H. R., Gabler, W. L. & Bullock, W. W. Endogenous component chemotactic assay (ECCA). *Inflammation* **7,** 321–329 (1983).
137. Martin, Y., Avendaño, C., Piedras, M. J. & Krzyzanowska, A. Evaluation of Evans Blue extravasation as a measure of peripheral inflammation. *Protoc. Exch.* (2010). doi:10.1038/protex.2010.209
138. Hees, H. & Sinowatz, F. *Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. (Deutscher Ärzte-Verlag, 2000).

139. Kiernan, J. A. *Histological and histochemical methods - Theory and practice*. (Scion Publishing Limited, 2008).
140. Gomori, G. Chloroacyl Esters as Histochemical Substrates. *J. Histochem. Cytochem.* **1,** 469–470 (1953).
141. Burstone, M. S. Esterase activity of developing bones and teeth. *Ama Arch. Pathol.* **63,** 164–167 (1957).
142. Tukey, J. W. *Exploratory Data Analysis*. (Addison-Wesley Publishing Company Reading, Mass, 1977).
143. Jayapal, M. *et al.* Genome-wide gene expression profiling of human mast cells stimulated by IgE or FcεRI-aggregation reveals a complex network of genes involved in inflammatory responses. *Bmc Genomics* **7,** 210 (2006).
144. Strik, M. C. M. *et al.* Human mast cells produce and release the cytotoxic lymphocyte associated protease granzyme B upon activation. *Mol. Immunol.* **44,** 3462–3472 (2007).
145. Aung, G. *et al.* Catestatin, a neuroendocrine antimicrobial peptide, induces human mast cell migration, degranulation and production of cytokines and chemokines. *Immunology* **132,** 527–539 (2011).
146. Feuser, K., Thon, K.-P., Bischoff, S. C. & Lorentz, A. Human intestinal mast cells are a potent source of multiple chemokines. *Cytokine* **58,** 178–185 (2012).
147. Gregory, G. D. & Brown, M. A. Mast cells in allergy and autoimmunity: implications for adaptive immunity. *Methods Mol. Biol. Clifton Nj* **315,** 35–50 (2006).
148. Rao, K. N. & Brown, M. A. Mast Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1143,** 83–104 (2008).
149. Gerard, C. & Gerard, N. P. C5A Anaphylatoxin and Its Seven Transmembrane-Segment Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **12,** 775–808 (1994).
150. Füreder, W. *et al.* Differential expression of complement receptors on human basophils and mast cells. Evidence for mast cell heterogeneity and CD88/C5aR expression on skin mast cells. *J. Immunol.* **155,** 3152–3160 (1995).
151. Ghannadan, M. *et al.* Phenotypic characterization of human skin mast cells by combined staining with toluidine blue and CD antibodies. *J. Invest. Dermatol.* **111,** 689–695 (1998).
152. Oskeritzian, C. A. *et al.* Surface CD88 functionally distinguishes the MCTC from the MCT type of human lung mast cell. *J. Allergy Clin. Immunol.* **115,** 1162–1168 (2005).
153. Church, M. K. & Clough, G. F. Human skin mast cells: in vitro and in vivo studies. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* **83,** 471–475 (1999).
154. Nigrovic, P. A. *et al.* C5a receptor enables participation of mast cells in immune complex arthritis independently of Fcγ receptor modulation. *Arthritis Rheum.* **62,** 3322–3333 (2010).
155. Zhao, W. *et al.* Fc gamma RIIa, not Fc gamma RIIb, is constitutively and functionally expressed on skin-derived human mast cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177,** 694–701 (2006).
156. Ramos, B. F., Qureshi, R., Olsen, K. M. & Jakschik, B. A. The importance of mast cells for the neutrophil influx in immune complex-induced peritonitis in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **145,** 1868–1873 (1990).

157. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv. Immunol.* **96,** 179–204 (2007).
158. Nocka, K. *et al.* Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine c-kit/white spotting locus: W37, Wv, W41 and W. *Embo J.* **9,** 1805–1813 (1990).
159. Reith, A. D. *et al.* W mutant mice with mild or severe developmental defects contain distinct point mutations in the kinase domain of the c-kit receptor. *Genes Dev.* **4,** 390–400 (1990).
160. Duttlinger, R. *et al.* The Wsh and Ph mutations affect the c-kit expression profile: c-kit misexpression in embryogenesis impairs melanogenesis in Wsh and Ph mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92,** 3754–3758 (1995).
161. Nagle, D. L., Kozak, C. A., Mano, H., Chapman, V. M. & Bućan, M. Physical mapping of the Tec and Gabrb1 loci reveals that the Wsh mutation on mouse chromosome 5 is associated with an inversion. *Hum. Mol. Genet.* **4,** 2073–2079 (1995).
162. Berrozpe, G. *et al.* A Distant Upstream Locus Control Region Is Critical for Expression of the Kit Receptor Gene in Mast Cells. *Mol. Cell. Biol.* **26,** 5850–5860 (2006).
163. Stevens, J. & Loutit, J. F. Mast cells in spotted mutant mice (W Ph mi). *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Contain. Pap. Biol. Character R. Soc. Gt. Br.* **215,** 405–409 (1982).
164. Rodewald, H.-R. & Feyerabend, T. B. Widespread Immunological Functions of Mast Cells: Fact or Fiction? *Immunity* **37,** 13–24 (2012).
165. Shimada, M. *et al.* Spontaneous stomach ulcer in genetically mast-cell depleted W/Wv mice. *Nature* **283,** 662–664 (1980).
166. Galli, S. J., Arizono, N., Murakami, T., Dvorak, A. M. & Fox, J. G. Development of large numbers of mast cells at sites of idiopathic chronic dermatitis in genetically mast cell-deficient WBB6F1-W/Wv mice. *Blood* **69,** 1661–1666 (1987).
167. Puddington, L., Olson, S. & Lefrançois, L. Interactions between stem cell factor and c-Kit are required for intestinal immune system homeostasis. *Immunity* **1,** 733–739 (1994).
168. Waskow, C., Terszowski, G., Costa, C., Gassmann, M. & Rodewald, H.-R. Rescue of lethal c-KitW/W mice by erythropoietin. *Blood* **104,** 1688–1695 (2004).
169. Zhou, J. S., Xing, W., Friend, D. S., Austen, K. F. & Katz, H. R. Mast cell deficiency in Kit(W-sh) mice does not impair antibody-mediated arthritis. *J. Exp. Med.* **204,** 2797–2802 (2007).
170. Nigrovic, P. A. *et al.* Genetic Inversion in Mast Cell-Deficient Wsh Mice Interrupts Corin and Manifests as Hematopoietic and Cardiac Aberrancy. *Am. J. Pathol.* **173,** 1693–1701 (2008).
171. Nigrovic, P. A. *et al.* Mast cells contribute to initiation of autoantibody-mediated arthritis via IL-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 2325–2330 (2007).
172. Kneilling, M. *et al.* Targeted mast cell silencing protects against joint destruction and angiogenesis in experimental arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* **56,** 1806–1816 (2007).
173. Mancardi, D. A. *et al.* Cutting Edge: The murine high-affinity IgG receptor FcγRIV is sufficient for autoantibody-induced arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186,** 1899–1903 (2011).
174. Robbie-Ryan, M., Tanzola, M. B., Secor, V. H. & Brown, M. A. Cutting Edge: Both Activating and Inhibitory Fc Receptors Expressed on Mast Cells Regulate Experimental Allergic Encephalomyelitis Disease Severity. *J. Immunol.* **170,** 1630–1634 (2003).

175. Tanzola, M. B., Robbie-Ryan, M., Gutekunst, C. A. & Brown, M. A. Mast Cells Exert Effects Outside the Central Nervous System to Influence Experimental Allergic Encephalomyelitis Disease Course. *J. Immunol.* **171,** 4385–4391 (2003).
176. Sayed, B. A., Walker, M. E. & Brown, M. A. Cutting Edge: Mast Cells Regulate Disease Severity in a Relapsing–Remitting Model of Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* **186,** 3294–3298 (2011).
177. Li, H. *et al.* Kit (W-sh) mice develop earlier and more severe experimental autoimmune encephalomyelitis due to absence of immune suppression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **187,** 274–282 (2011).
178. Piconese, S. *et al.* Exacerbated experimental autoimmune encephalomyelitis in mast-cell-deficient Kit W-sh/W-sh mice. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **91,** 627–641 (2011).
179. Scholten, J. Novel tools for mast cell research: Mast cell-specific Cre-mediated gene inactivation and inducible ablation of mast cells in vivo. (2009).
180. Grimbaldeston, M. A., Nakae, S., Kalesnikoff, J., Tsai, M. & Galli, S. J. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat. Immunol.* **8,** 1095–1104 (2007).
181. Wintroub, B. U., Mihm, M. C., Goetzl, E. J., Soter, N. A. & Austen, K. F. Morphologic and Functional Evidence for Release of Mast-Cell Products in Bullous Pemphigoid. *N. Engl. J. Med.* **298,** 417–421 (1978).
182. Ujiie, H., Shibaki, A., Nishie, W. & Shimizu, H. What's new in bullous pemphigoid. *J. Dermatol.* **37,** 194–204 (2010).
183. Provost, T. T. & Tomasi, T. B. Immunopathology of bullous pemphigoid. Basement membrane deposition of IgE, alternate pathway components and fibrin. *Clin. Exp. Immunol.* **18,** 193–200 (1974).
184. Nelson, K. C. *et al.* Role of different pathways of the complement cascade in experimental bullous pemphigoid. *J. Clin. Invest.* **116,** 2892–2900 (2006).
185. Yu, X. *et al.* FcγRIIA and FcγRIIIB are required for autoantibody-induced tissue damage in experimental human models of bullous pemphigoid. *J. Invest. Dermatol.* **130,** 2841–2844 (2010).
186. Zhang, Q. *et al.* Inefficient antimicrobial functions of innate phagocytes render infant mice more susceptible to bacterial infection. *Eur. J. Immunol.* (2013). doi:10.1002/eji.201243077
187. Stelekati, E. *et al.* Mast cell-mediated antigen presentation regulates CD8+ T cell effector functions. *Immunity* **31,** 665–676 (2009).
188. Bennett, J. L. *et al.* Bone Marrow-Derived Mast Cells Accumulate in the Central Nervous System During Inflammation but Are Dispensable for Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Pathogenesis. *J. Immunol.* **182,** 5507–5514 (2009).
189. Feyerabend, T. B. *et al.* Cre-Mediated Cell Ablation Contests Mast Cell Contribution in Models of Antibody- and T Cell-Mediated Autoimmunity. *Immunity* **35,** 832–844 (2011).
190. Pitman, N., Asquith, D. L., Murphy, G., Liew, F. Y. & McInnes, I. B. Collagen-induced arthritis is not impaired in mast cell-deficient mice. *Ann. Rheum. Dis.* **70,** 1170–1171 (2011).

Danksagung

Ich danke zu allererst und ganz besonders Herrn Prof. Dr. Frank Petersen für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Forschungsgruppe anzufertigen. Seine in dieser Zeit immer währende Bereitschaft für Diskussionen, fachliche Hilfestellungen und Anregungen haben mich in dieser Arbeit sehr unterstützt. Ohne sein Engagement und seine konstruktive Kritik wäre diese Arbeit weniger erfolgreich geworden.

Auch möchte ich mich bei Dr. Xinhua Yu für die fachliche Betreuung und gelegentlich praktische Unterstützung der letzten drei Jahre bedanken. Die Einarbeitung in die etablierten Mausexperimente hat mir am Anfang meiner Arbeit viel Zeit erspart.

Allen anderen Mitgliedern der Forschungsgruppe Biochemische Immunologie, Dr. Brigitte Kasper, Cindy Hass, Gabrielle Huß, Carola Schneider, Christine Engellenner, Diana Heinrich, Junie Diane Tchudjin Magatsin, Reza Akbarzadeh Najar und Marjan Ahmadi, gilt mein Dank für die täglich angenehme Arbeitsatmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft beim Etablieren und Durchführen von Methoden. Besonders Carola Schneider war mir beim Anfertigen der zahllosen Gewebeschnitte eine große Hilfe, ohne die ich für diese Arbeit einige Monate länger gebraucht hätte.

Im Einzelnen möchte ich auch nochmal Gabrielle Huß, Cindy Hass und Junie Tchudjin danke sagen, dass sie ein unermüdliches Vertrauen in mich hatten und mich in den letzten Monaten moralisch sehr unterstützt haben. Darüberhinaus bin ich Cindy sehr dankbar für die sehr angenehme Zusammenarbeit, tatkräftige Unterstützung und ständige gute Laune bei unseren zahlreichen gemeinsamen Tagen im Tierstall.

Meinem Zweitbetreuer der Doktorarbeit, Herrn Dr. Christoph Hölscher, danke ich für die kritische Begutachtung meiner Daten und die sich daraus ergebenen Diskussionen.

Ein Dankeschön geht an die Kooperationspartner Frau Dr. Olivia Prazeres da Costa vom Expression Core Facility an der TU München für die Durchführung der Microarray-Analyse und an die Arbeitsgruppe Autoimmunität der Abteilung Dermatologie der Universität zu Lübeck für die Bereitstellung der Kaninchenseren, die ich in meinen *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten eingesetzt habe.

Bei meiner Familie und meinen Freunden bedanke ich mich für ihre ununterbrochene Unterstützung und Zuversicht und für ein Leben neben der Arbeit, was zu meinem Ausgleich und damit auch zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Thomas, dir möchte ich ganz besonders danken, dass du während des gesamten Schreibprozesses für mich da warst, meine ständig schwankenden Launen geduldig und optimistisch ertragen und meine gelegentlich angespannten Nerven beruhigt hast. Danke für deine hilfreichen, wenn auch oftmals frustrierenden Kommentare zu dieser Arbeit. Deine Unterstützung hat mir sehr geholfen.

Eidesstattliche Erklärung zur Dissertation

Ich versichere hiermit, dass ich die anliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, habe ich in jedem Falle durch Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Lübeck, 2013

Anika Kasprick