

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis X

Abbildungsverzeichnis XIII

Tabellenverzeichnis XIV

1. EINLEITUNG

1.1 AUFBAU UND FUNKTION DER HAUT 1

1.2 BLASENBILDENDE AUTOIMMUNDERMATOSEN 4

1.3 EPIDERMOLYSIS BULLOSA ACQUISITA 7

 1.3.1 Klinische Manifestation 7

 1.3.2 Pathogenese 9

 1.3.3 Diagnostik und Therapie 13

1.4 ZIRKADIANE RHYTHMIK 15

 1.4.1 Bedeutung biologischer Rhythmen im Organismus von Säugetieren 17

 1.4.2 Anatomischer Aufbau des zentralen endogenen Zeitgebers 18

 1.4.3 Synchronisation des Nucleus suprachiasmaticus mit der Umwelt 22

 1.4.4 Periphere Zeitgeber in verschiedenen Organen 25

 1.4.5 Das zirkadiane System auf molekularer Ebene 28

 1.4.5.1 *Brain and Muscle Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*
 ARNT-like 1 31

 1.4.5.2 *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput* 31

 1.4.5.3 *Period 1-3* 32

 1.4.5.4 *Cryptochrome 1-2* 36

 1.4.5.5 *Retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor α* 37

 1.4.6 Zirkadiane Rhythmen in der Haut 39

 1.4.7 Zirkadiane Rhythmen im Immunsystem 43

 1.4.8 Zirkadiane Rhythmen und Autoimmunerkrankungen 49

1.5 ZIELE DER ARBEIT	50
2. MATERIAL	
2.1 GERÄTE	53
2.2 MEDIKAMENTE	56
2.3 ANTIKÖRPER	57
2.4 REAGENZIEN	58
2.5 PUFFER UND LÖSUNGEN	62
2.6 PRIMER	66
2.7 KITS	68
2.8 VERBRAUCHSMATERIALIEN	69
2.9 SOFTWARE	71
3. METHODEN	
3.1 GENEHMIGUNG DER TIERVERSUCHE	72
3.2 MÄUSE	72
3.2.1 C57BL/6-J	72
3.2.2 Lys-eGFP-ki+	73
3.3 MAUSHALTUNG	74
3.3.1 Haltungsparemeter und Käfige	75
3.3.2 Fütterung	76
3.3.3 Schlafboxen	76
3.4 TIERVERSUCHE	77
3.4.1 Anästhesie	77
3.4.2 Blutentnahme	79
3.4.2.1 Blutentnahme für die Durchflusszytometrie	79
3.4.2.2 Blutentnahme für die quantitative Bestimmung von Kortikosteron	80
3.4.3 Charakterisierung des tagesrhythmischen Profils von neutrophilen Granulozyten	80

3.4.4 Antikörpertransfer-induziertes Mausmodell der Epidermolysis bullosa <i>acquisita</i>	84
3.4.4.1 Isolierung von Immunglobulin G aus Kaninchenserum.....	88
3.4.4.2 Herstellung einer Säule zur Affinitätsaufreinigung spezifischer Antikörper gegen murines Kollagen Typ VIIc.....	90
3.4.4.3 Qualitätssicherung der einzelnen Arbeitsschritte der Säulenherstellung mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	94
3.4.4.4 Funktionsprüfung der hergestellten Säule mittels <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	96
3.4.4.5 Affinitätsaufreinigung spezifischer Antikörper gegen murines Kollagen Typ VIIc.....	98
3.4.4.6 Fluoreszenzmarkierung des hergestellten Antikörpers für die Zwei-Photonen Mikroskopie.....	100
3.4.4.7 Testung der Bindungskapazität des spezifischen Antikörpers gegen murines Kollagen Typ VIIc.....	100
3.4.5 Quantifizierung der betroffenen Körperoberfläche.....	101
3.4.6 Visualisierung der Extravasation neutrophiler Granulozyten mittels Zwei-Photonen Mikroskopie.....	103
3.5 EUTHANASIE.....	106
3.6 PROBENNAHME.....	106
3.6.1 Probennahme für die RNA-Isolierung.....	107
3.6.2 Probennahme für die Immunhistochemie.....	107
3.6.3 Probennahme für die Immunfluoreszenz.....	108
3.6.4 Probennahme für das Verfahren zum Nachweis der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies.....	108
3.7 QUANTIFIZIERUNG DES MURINEN LEUKOGRAMMS MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	109
3.8 RNA-ISOLIERUNG AUS MURINEN PROBEN.....	112
3.8.1 DNase Behandlung der isolierten RNA.....	114
3.8.2 Konzentrationsbestimmung der RNA.....	116
3.9 cDNA-SYNTHESE.....	116

3.10 POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR).....	118
3.10.1 Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR (qRT-PCR).....	120
3.11 QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON KORTIKOSTERON IN MURINEM SERUM.....	123
3.12 VERFAHREN ZUM NACHWEIS DER FREISETZUNG REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES AUS HUMANEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN.....	125
3.13 VERFAHREN ZUM NACHWEIS DER FREISETZUNG REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES AUS MURINEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN.....	128
3.14 HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG.....	130
3.14.1 Histochemische Färbung von Gewebeschnitten und mikroskopische Auswertungen.....	131
3.14.2 Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten und mikroskopischen Auswertungen.....	132
3.15 STATISTISCHE AANALYSEN DER ERGEBNISSE.....	133
4. ERGEBNISSE	
4.1 TAGESRHYTHMISCHES PROFIL DES MURINEN LEUKOGRAMMS.....	135
4.2 FUNKTIONSNACHWEIS DER HERGESTELLTEN SÄULE ZUR AUFREINIGUNG DES SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERS.....	140
4.3 BINDUNG DES SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERS AN DER DERMO-EPIDERMALEN JUNKTIONSZONE.....	142
4.4 PATHOGENITÄTSNACHWEIS DES SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERS IN DER MAUS....	144
4.5 SYMPTOME DER EPIDERMOLYSIS BULLOSA ACQUISITA WEISEN EINEN TAGESZEITLICHEN UNTERSCHIED IM LEUKOGRAMM AUF.....	145
4.6 DIE INDUKTION DER EPIDERMOLYSIS BULLOSA ACQUISITA HEBT DEN TAGESZEITLICHEN UNTERSCHIED DER NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN AUF....	146
4.7 DIE MIGRATION DER NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN ZEIGT EINEN TAGESZEITLICHEN UNTERSCHIED.....	148
4.8 RESULTATE DER qRT-PCR.....	150
4.8.1 Zirkadiane Oszillation der Uhrgene in verschiedenen murinen Organen.....	150
4.8.2 Einfluss der Induktion der Epidermolysis bullosa acquisita auf die Oszillation der Uhrgene.....	154

4.8.3 Das Uhrgen Per2 zeigt eine Korrelation zwischen der Schwere der Symptome der Epidermolysis bullosa acquisita und seiner Expression.....	157
4.8.4 Es gibt einen tageszeitlichen Unterschied in der Expression proinflammatorischer Gene.....	158
4.9 RESULTATE DER QUANTITATIVEN BESTMMUNG VON KORTIKOSTERON IN MURINEM SERUM.....	160
4.9.1 Die Kortikosteronkonzentration im Serum im tageszeitlichen Verlauf.....	161
4.9.2 Die Kortikosteronkonzentration beeinflusst den tageszeitlichen Unterschied der Symptome nicht.....	162
4.10 RESULTATE DER MESSUNG REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES.....	163
4.10.1 Humane neutrophile Granulozyten zeigen einen tageszeitlichen Verlauf im peripheren Blut.....	164
4.10.2 Humane neutrophile Granulozyten zeigen keinen tageszeitlichen Unterschied in der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies.....	165
4.10.3 Murine neutrophile Granulozyten zeigen keinen tageszeitlichen Unterschied in der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies.....	166
4.11 HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG.....	166
4.11.1 An Gewebeschnitten von Ohren gesunder Mäuse sind keine tageszeitlichen Unterschiede zu erkennen.....	167
4.11.2 An Gewebeschnitten von Ohren sind Symptome der Epidermolysis bullosa acquisita nachweisbar.....	168
4.11.3 An Gewebeschnitten von Ohren lagert sich die Komplementkomponente C3 gemeinsam mit Immunglobulin G an der dermo-epidermalen Junktionszone ab.....	169
4.11.4 An Gewebeschnitten von Ohren lassen sich neutrophile Granulozyten histologisch nachweisen.....	170
5.DISKUSSION	
5.1 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE VOR DEM DERZEITIGEN STAND DER WISSENSCHAFT.....	171
5.2 MÖGLICHES PATHOGENESEMDELL ZUM EINFLUSS DER ZIRKADIANEN RYTHMIK AUF DIE ENTWICKLUNG DER EBA.....	189
5.2.1 Eine innere Uhr in den neutrophilen Granulozyten steuert die tageszeitlichen Unterschiede in der Entwicklung der EBA.....	190

5.2.1 Eine innere Uhr in derHaut steuert die tageszeitlichen Unterschiede in der Entwicklung der EBA	192
5.3 AUSBLICK AUF ZUKÜNFTIGE FORSCHUNGSVORHABEN	194
6. ZUSAMMENFASSUNG	196
7. SUMMARY	198
8. LITERATURVERZEICHNIS	200
9. DANKSAGUNG	228
10. ERKLÄRUNG	235