

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	X
Abbildungsverzeichnis .....	XIII
Tabellenverzeichnis .....	XIV
<b>1. EINLEITUNG</b>	
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 <i>Brain and Muscle Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator ARNT-like 1</i> .....	31
1.4.5.2 <i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i> .....	31
1.4.5.3 <i>Period 1-3</i> .....	32
1.4.5.4 <i>Cryptochrome 1-2</i> .....	36
1.4.5.5 <i>Retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor α</i> .....	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
<b>2. MATERIAL</b>	
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
<b>3. METHODEN</b>	
3.1 GENEHMIGUNG DER TIERVERSUCHE .....	72
3.2 MÄUSE .....	72
3.2.1 C57BL/6-J .....	72
3.2.2 Lys-eGFP-kit+ .....	73
3.3 MAUSHALTUNG .....	74
3.3.1 Haltungsparameter 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

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

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
<b>4. ERGEBNISSE</b>	
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 Uhrengene in verschiedenen murinen Organen.....	150
4.8.2 Einfluss der Induktion der Epidermolysis bullosa acquisita auf die Oszillation der Uhrengene.....	154

4.8.3 Das Uhrengehen 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
<b>5. DISKUSSION</b>	
5.1 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE VOR DEM DERZEITIGEN STAND DER WISSENSCHAFT.....	171
5.2 MÖGLICHES PATHOGENESEMODELL 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 der Haut steuert die tageszeitlichen Unterschiede in der Entwicklung der EBA.....	192
5.3 AUSBLICK AUF ZUKÜNTIGE FORSCHUNGSVORHABEN.....	194
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>196</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>198</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>200</b>
<b>9. DANKSAGUNG.....</b>	<b>228</b>
<b>10. ERKLÄRUNG.....</b>	<b>235</b>