Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck Direktor: Prof. Dr. med. D. Zillikens

Morphologische und funktionelle Charakterisierung neutrophiler Granulozyten in *Alox15*-defizienten Mäusen

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

Vorgelegt von

TILL MALTE SEUTTER

aus Bad Oldesloe

Lübeck 2020

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Sadik
 Berichterstatter: Prof. Dr. med. Siegfried Görg
 Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2021
 Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.02.2021
 -Promotionskommission der Sektion Medizin-

Ayla, meiner Schwester Ann-Kristin und meinem Vater in liebender Erinnerung gewidmet

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	<u> </u>
TABELLENVERZEICHNIS	<u> </u>
1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
1.1 NEUTROPHILE GRANULOZYTEN	1
1.2 LIPOXYGENASEN	2
1.3 12/15-Lipoxygenase	3
1.3.1 12/15-LOX UND HÄMATOLOGIE	4
1.3.2 12/15-LOX IN ENTZÜNDUNG	5
1.3.2.1 Beendigung einer Entzündungsreaktion	5
1.3.2.2 Pro- und antientzündliche Produkte der 12/15-LOX	6
1.3.3 12/15-LOX UND AUTOIMMUNITÄT	7
1.3.3.1 Autoimmunität	7
1.3.3.2 Die Bedeutung der 12/15-LOX für den Erhalt der immunologischen Toleranz	8
1.4 NEUTROPHILE GRANULOZYTEN IN 12/15-LIPOXYGENASE-GENDEFIZIENTEN MÄUSEN	9
1.5 ZIEL DER ARBEIT	11
2. MATERIAL UND METHODEN	12
2.1 MATERIALIEN	12
2.2 MÄUSE	12
2.3 METHODEN	12
2.3.1 Teil 1: Morphologische und funktionelle <i>in vitro</i> Charakterisierung der Subpopulati	ONEN
NEUTROPHILER GRANULOZYTEN IN 12/15-LIPOXYGENASE-GENDEFIZIENTEN MÄUSEN	12
2.3.1.1 Durchflusszytometrie	12
2.3.1.2 Isolierung von murinem Knochenmark	15
2.3.1.3 Isolierung von PMN aus murinem Knochenmark	15
2.3.1.4 Isolierung von <i>Alox15^{-/-}</i> SSC ^{high} and <i>Alox15^{-/-}</i> SSC ^{low} PMN	16
2.3.1.5 ROS-Freisetzungs-Assay	17
2.3.1.6 NETosis-Assay	18
2.3.1.7 Transmissionselektronenmikrospkopie	19
2.3.1.8 Phagozytose-Assay	20

2.3.1.9 Zell-Zyklus-Analyse	21		
2.3.1.10 Statistik 22			
2.3.2 Teil 2: Funktionelle <i>IN VIVO</i> CHARAKTERISIERUNG NEUTROPHILER GRANULOZYTEN IN			
12/15-Lipoxygenase-gendefizienten Mäusen	22		
2.3.2.1 Epidermolysis bullosa acquisita	22		
2.3.2.2 EBA-Modelle	24		
2.3.2.3 Versuchsablauf des passiven EBA-Modells	25		
2.3.2.4 Generierung von Kaninchen-anti-Maus-COL7c-IgG	25		
2.3.2.5 Knochenmarkstransplantationschimären	28		
2.3.2.6 Beurteilung der Krankheitsausprägung des Antikörper-Transfer-EBA-Modells	; 31		
2.3.2.7 Präparierung peripherer Blut-Zellen zur FC-Analyse	32		
2.3.2.8 Histopathologie	33		
2.3.2.9 Statistik	33		
<u>3. ERGEBNISSE</u>	35		
3.1 ALOX15 DEFIZIENZ FÜHRT ZU EINER ÜBERAKTIVEN PMN SUBPOPULATION, DIE ABWEICHUNG	GEN DES		
ZELLKERNS AUFWEIST	35		
3.1.1 ALOX15 ^{-/-} SSC ^{HIGH} PMN ZEIGEN EINEN GESTEIGERTEN OXIDATIVE BURST	35		
3.1.2 ALOX15 ^{-/-} SSC ^{HIGH} PMN BILDEN MEHR NETS	38		
3.1.3 ALOX15 ^{-/-} SSC ^{HIGH} PMN HABEN EINE GESTEIGERTE PHAGOZYTOSEAKTIVITÄT	39		
3.1.4 ALOX15 ^{-/-} SSC ^{HIGH} PMN SIND HYPERSEGMENTIERT	40		
3.1.5 ALOX15 ^{-/-} SSC ^{HIGH} PMN HABEN EINEN GESTÖRTEN ZELLZYKLUS	41		
3.2 ALOX15 ^{-/-} PMN SIND IN VIVO IN DER LAGE, IHRE EFFEKTORFUNKTION AUSZUÜBEN	43		
3.2.1 REAKTIVITÄT DES ISOLIERTEN KANINCHEN-ANTI-MCOL7C-IGGS	43		
3.2.2 NACHWEIS DER ERFOLGREICHEN KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION MITTELS DURCHFLUSSZ	YTOMETRIE 44		
3.2.3 KANINCHEN-ANTI-MCOL7C-IGG FÜHRT IN VIVO ZU EINER DERMOEPIDERMALEN SPALTBILDU	NG 45		
3.2.4 ALOX15 ^{-/-} PMN SIND IN VIVO IN DER LAGE, EINE GEWEBESCHÄDIGUNG HERBEIZUFÜHREN	45		
3.2.5 MÄUSE MIT ALOX15 ^{-/-} KM ZEIGEN EIN GESTÖRTES DIFFERENTIALBLUTBILD	47		
4. DISKUSSION	49		
4.1 CHARAKTERISIERUNG DER REIDEN ALOY $15^{-/-}$ DMN Surdonul Ationen	40		
4.1 CHARACTERISTERIONS DER BEIDEN ALOXIS FININ SUBPOPULATIONEN $1.1 - \Lambda_{LOX} - 15^{-/-}$ SSC ^{HIGH} DMN zeigen eine gesteigebte Elektropeliniktion	49 /10		
	49 F		
	<u>-</u> גח		
	50		
TIZ ALUALU PININ FURKEN IN VIVO LUK GEWEDESCHADIGUNG 33			

4.3	12/15-LOX DEFIZIENZ FÜHRT ZU EINER VERZÖGERTEN AUFLÖSUNG DER ENTZÜNDUNG	54
4.4	ALOX15 ^{-/-} PMN ALS MÖGLICHE MODULATOREN DER EBA	56
4.5	HÄMATOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DURCH DIE 12/15-LOX	56
4.6	Alternative Alox15 ^{-/-} Modelle und Ausblick	59
<u>5. Z</u>	USAMMENFASSUNG	62
<u>6. LI</u>	TERATURVERZEICHNIS	64
<u>7. A</u>	NHÄNGE	79
7.1	MATERIALIEN	79
7.1.1	Reagenzien	79
7.1.2	Antikörper	81
7.1.3	Primer	81
7.1.4	Geräte	82
7.1.5	VERBRAUCHSMATERIAL	83
7.1.6	Kommerziell erhältliche Puffer, Lösungen und Kits	84
7.1.7	Software	84
7.1.8	BIOLOGISCHES MATERIAL	84
7.1.9	Selbst hergestellte Puffer und Medien	85
7.2	Sonstiges	87
7.2.1	TABELLE: SUBSTRATE UND PRODUKTE DER $12/15$ -LOX und deren biologische Funktion	87
7.2.2	Statistik ROS-Freisetzung	89
7.2.3	STATISTIK DER LEUKOZYTENMIGRATION IM BLUT IN EXPERIMENTELLER EBA	91
<u>8.</u> D	ANKSAGUNG	93
9. LI	EBENSLAUF	94

Abkürzungsverzeichnis

12(S)-HETE	12(S)-Hydroxyeicosapentaensäure
12(S)-HPETE	12(S)-Hydroperoxyeicosapentaensäure
15(S)-HETE	15(S)-Hydroxyeicosapentaensäure
AA	Arachidonsäure
AAK	Autoantikörper
AK	Antikörper
<i>Alox15^{-/-}</i>	
AUC	Fläche unterhalb der Kurve
BD	Becton, Dickinson and Company
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
COL7	Kollagen VII
COX	Cyclooxygenase
DAPI	
DC	Dendritische Zellen
DEJ	Dermoepidermale Junktionszone
DHA	Docosahexaensäure
Dm	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	
ЕВА	Epidermolysis bullosa acquisita
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ЕРА	Eicosapentaensäure
FA	Fettsäure
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
FC	Durchflusszytometrie
FCS	Fetales Kälberserum
Flp	Flippase
FSC	Vorwärtsstreulicht
Gy	Gray (Einheit)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His-Tag	Polyhistidin-Tag
HSA	Humanalbumin
I K	Immunkomplex
ICSBP	Interferon-Konsensussequenzbindendes Protein
lgG	Immunglobulin G
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
IRES	Interne Ribosomale Eintrittsstelle
КМ	Knochenmark
ко	Knockout
LOX	Lipoxygenase
MFG-E8	Milk Fat Globule-EGF Factor 8

MPO	Myeloperoxyidase
Μφ	Makrophage
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NC1	Nichtkollagendomäne 1
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
рА	Polyadenylierungssequenz
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
РКВ	Proteinkinase B
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMNs	Neutrophile Granulozyten
PS	Phosphatidylserin
ResМф	Geweberesidente, alternativ aktivierte Makrophagen
RLU	Relative Lichteinheit
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SA	Spleißakzeptor
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SOD	Superoxiddismutase
SPM	Specialized Proresolving Lipid Mediators
SSC	Seitwärtsstreulicht
SSC ^{high}	Population mit hohem Signal im Seitwärtsstreulicht
SSC ^{low}	Population mit niedrigem Signal im Seitwärtsstreulicht
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
Tim-4	T-Cell Membrane Protein 4
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Alox15 ^{-/-} PMN sind morphologisch verändert10
Abbildung 2: Autoantigene der Zellverbindungen der Haut
Abbildung 3: Aufbau Kollagen VII26
Abbildung 4: Generierung von Knochenmarkchimären
Abbildung 5: ROS-Freisetzung im Zeitverlauf
Abbildung 6: normalisierte ROS-Freisetzung
Abbildung 7: NETose Auswertung
Abbildung 8: mikroskopische Bilder NETose
Abbildung 9: normalisierte Phagozytoserate in SSC ^{high} PMN erhöht
Abbildung 10: Alox15 ^{-/-} SSC ^{high} PMN sind teilweise hypersegmentiert
Abbildung 11: Zellzyklusanalyse Jurkat Zellen42
Abbildung 12: Zellzyklusanalyse zeigt einen Großteil der Alox15 ^{-/-} SSC ^{high} PMN in G2-Phase
Abbildung 13: Transplantationserfolg44
Abbildung 14: beispielhafte Darstellung der Spaltbildung in der dermoepidermalen
Junktionszone
Abbildung 15: stärkere Krankheitsausprägung in $Alox15^{-/-} \rightarrow Alox15^{-/-}$ Mäusen in zweiter
Hälfte des Experiments
Abbildung 16: Differentialblutbild im Verlauf der AK-Transfer-EBA in Alox15 ^{-/-} Mäusen
gestört
Abbildung 17: Knockout-first-Allel

Tabellenverzeichnis

Fabelle 1: Pro- und antientzündliche Effekte der 12/15-Lipoxygenase	7
Tabelle 2: Prozentualer Anteil einzelner Körperregionen an gesamter Körperoberfläche	32
Fabelle 3: Statistik der Krankheitsausprägung an Tag 14, 18 und 21	46
Tabelle 4: Substrate und Produkte der 12/15-LOX und deren biologische Funktion	87
Freisetzungs-Assays	89
Fabelle 6: Statistik der Leukozytenmigration im Blut im Zeitverlauf der experimentellen E	ΒA
	91

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten bzw. Polymorphkernige Neutrophile (PMN) sind als eine Zellpopulation von Leukozyten an der Abwehr von Pathogenen beteiligt. Sie sind die ersten Zellen, die bei einer Entzündungsreaktion aus dem Blut ins Gewebe rekrutiert werden und damit ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems (Nathan 2006). Zu ihrem antimikrobiellen Repertoire gehören u. a. die Phagozytose, die Ausschüttung von Granula, die Bildung von extrazellulären Netzen aus Desoxyribonukleinsäure (NETs, von engl. *Neutrophil Extracellular Traps*) sowie die Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, von engl. *Reactive Oxygen Species*) (Holmes et al. 1967; Brinkmann et al. 2004; Kolaczkowska und Kubes 2013). Durch diese zahlreichen Mechanismen sind sie sehr potente Werkzeuge im Kampf gegen fremde Genome. Sie können aber, wenn inadäquat aktiviert, auch erhebliche Schäden anrichten (Nathan 2006; Kolaczkowska und Kubes 2013).

PMN besitzen drei Arten von Granula, die sowohl mit der Plasmamembran als auch mit dem Phagosom verschmelzen können: Die primären oder azurophilen Granula enthalten die für PMN spezifische Myeloperoxidase (MPO), die bei der Modifikation von ROS bedeutsam ist. Sekundäre und tertiäre Granula beinhalten sowohl bakterizide Proteine wie Lactoferrin und Lysozym als auch Metalloproteasen, die die Rekrutierung von PMN erleichtern, aber auch bei der Gewebezerstörung eine Rolle spielen (Nathan 2006; Kolaczkowska und Kubes 2013). Der sogenannte *Respiratory Burst*, bei dem eine große Anzahl an ROS in kurzer Zeit gebildet werden, ist ebenfalls am Gewebeuntergang beteiligt (Henson und Johnston 1987). Gleichzeitig ermöglicht er jedoch erst die Abtötung intra- und extrazellulärer Pathogene und ist daher überlebensnotwendig, wie am seltenen Krankheitsbild der septischen Granulomatose deutlich wird (Holmes et al. 1967).

2004 beschrieben Brinkmann und Kollegen, dass aktivierte PMN neben Granula auch ihr Chromatin auswerfen können. Hierdurch bilden sich extrazellulär Netze aus Desoxyribonukleinsäure (DNS) und Proteinen, die in der Lage sind, Bakterien einzufangen und abzutöten (Brinkmann et al. 2004). Die NETose stellt eine Form des regulierten Zelltodes dar. Es gibt jedoch Hinweise einer vitalen NETose, bei der die Zellen nach Abgabe der NETs weiterhin Bakterien phagozytieren und abtöten können. Die NETose ist

demzufolge nicht zwangsläufig mit Zelllyse bzw. -tod verbunden (Yousefi et al. 2009; Yang et al. 2016; Galluzzi et al. 2018).

Im Knochenmark (KM) gebildet, gehen PMN aus myeloischen Vorläuferzellen hervor. Vollständig differenzierte PMN befinden sich dauerhaft in der GO- bzw. G1-Phase: Jedes Chromosom besteht aus nur einem Chromatid und die Zellen teilen sich nicht mehr (Boll und Fuchs 1970; Klausen et al. 2004). Im Laufe der Reifung segmentiert sich der Kern eines PMN. Während junge PMN einen stabförmigen Kern haben, besteht der Kern eines adulten PMN aus drei bis fünf Segmenten (Campbell et al. 1995). Neutrophile machen beim Menschen zwischen 40 und 75 Prozent der gesamten Leukozyten aus (Löffler 2009). Dieser Wert ist bei der Maus mit etwa 15 Prozent deutlich niedriger. Dagegen ist der Anteil der Lymphozyten mit etwa 80 Prozent deutlich höher als beim Menschen (Charles River Research Models 2019). Ihre Lebensdauer ist zwar nicht leicht zu bestimmen (Tak et al. 2013), jedoch sind PMN mit einer Halbwertzeit zwischen vier (Peters et al. 1988) und 90 Stunden (Pillay et al. 2010) kurzlebige Zellen. Bei Betrachtung der großen Anzahl neutrophiler Granulozyten und der relativ geringen Lebensdauer wird deutlich, dass sie kontinuierlich in großer Anzahl neu gebildet werden müssen.

1.2 Lipoxygenasen

Während die Cyclooxygenasen (COX) Schlüsselenzyme für die Synthese der Prostaglandine sind, ermöglichen die Lipoxygenasen (LOX) die Synthese einer großen Anzahl verschiedener Lipidmediatoren. So sind die LOX im Gegensatz zu den COX eine weitaus heterogenere Gruppe von Enzymen (Dubois et al. 1998; Haeggström und Funk 2011). Der erste Vertreter im Menschen wurde 1974 nachgewiesen (Hamberg und Samuelsson 1974). Sie katalysieren die Dioxygenierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs, von engl. *Polyunsaturated Fatty Acids*). Vornehmlich verwenden sie Arachidonsäure (AA, von engl. *Arachidonic Acid*), Docosahexaensäure (DHA, von engl. *Docosahexaenoic Acid*) und Eicosapentaensäure (EPA, von engl. *Eicosapentaenoic Acid*) als Substrat (Kuhn et al. 2014). Wenngleich auch die Dioxygenierung von Phospholipiden beschrieben ist (Schewe et al. 1975; Kuhn et al. 2014), sind die meisten LOX lediglich in der Lage freie Fettsäuren (FA, von engl. *Fatty Acid*) zu dioxygenieren. Diese müssen zunächst aus der Zellmembran mobilisiert werden. Wird dies beispielsweise durch die zytosolische Phospholipase A2 katalysiert, so

können die freigesetzten Fettsäuren durch COX zu Prostaglandinen oder durch LOX zu Hydroperoxiden oxidiert werden (Haeggström und Funk 2011; Kuhn et al. 2014).

Diese Hydroperoxide sind Zwischenprodukte, die anschließend weiter zu verschiedenen Lipidmediatoren verstoffwechselt werden. Aufgrund ihrer pathophysiologischen Bedeutung sind ihre prominentesten Vertreter die proinflammatorischen Leukotriene. Neben ihrer Bedeutung bei der Regulation von Entzündungsreaktionen sind die Stoffwechselprodukte der LOX an zahlreichen Prozessen im Körper beteiligt. Unter anderem spielen sie bei der Zellentwicklung und -proliferation sowie der Regulation kardiovaskulärer Funktionen eine wichtige Rolle (Haeggström und Funk 2011; Kuhn et al. 2014).

Der Name einer LOX richtet sich nach dem C-Atom der Arachidonsäure, an dem es bevorzugt die Peroxidgruppe einfügt. Die 5-Lipoxygenase inseriert die Peroxidgruppe beispielsweise bevorzugt am fünften C-Atom. Kommt in der gleichen Spezies mehr als eine Lipoxygenase mit derselben Spezifität vor, wird zusätzlich noch das Gewebe angegeben, welches für diese LOX typisch ist, bzw. aus dem die Lipoxygenase primär isoliert wurde. Auch kann die Chiralität des Produkts zur genaueren Bezeichnung angegeben werden, wenn eine LOX nur die Synthese von Produkten mit einer Stereokonfiguration katalysiert (Brash 1999). So gibt es beim Menschen beispielsweise die 12-LOX vom Plättchen-Typ und die 12R-LOX. Insgesamt besitzt der Mensch sechs, die Maus sieben LOX (Funk 1996).

1.3 12/15-Lipoxygenase

Die murine 12/15-Lipoxygenase ist das Ortholog der humanen 15-Lipoxygenase-1 und wird durch das Gen *Alox15* kodiert (Funk et al. 2002; Singh und Rao 2019). Die beiden Enzyme unterscheiden sich vor allem in ihrer Spezifität: Die murine 12/15-LOX katalysiert eine Dioxygenierung am C-12 und in geringerem Maße am C-15 Atom. Wird Arachidonsäure dioxygeniert, so wird vorwiegend 12(S)-Hydroperoxyeicosapentaensäure (12(S)-HPETE) und in geringerem Maße 15(S)-HPETE synthetisiert. Das humane Ortholog hat eine umgekehrte Spezifität, bevorzugt somit die Dioxygenierung am C-15 Atom und synthetisiert bevorzugt 15(S)-HPETE. Die humane 15-LOX-1 und die murine 12/15-LOX sind aber trotz gering unterschiedlicher Spezifität evolutionär und funktionell eng verwandt (Singh und Rao 2019).

Vornehmlich werden AA, Linolsäure, DHA und EPA als Substrat verwendet. Die direkten Produkte der 12/15-LOX sind sehr kurzlebig (Singh und Rao 2019). Innerhalb von Sekunden werden 12(S)- bzw. 15(S)-HPETE durch die Glutathionperoxidase zu 12(S)- bzw. 15(S)-Hydroxyeicosapentaensäure (12(S)-HETE bzw. 15(S)-HETE) reduziert (Ochi et al. 1992; Ackermann et al. 2017). Eine Übersicht über wichtige Metabolite der 12/15-LOX und deren biologische Funktion ist im Anhang unter Tabelle 4 auf Seite 87 f. angegeben.

Die 12/15-LOX wird konstitutiv u. a. in Retikulozyten, eosinophilen Granulozyten und unreifen dendritischen Zellen exprimiert. Ihre Expression ist jedoch in einer Reihe von Zelltypen induzierbar. Monozyten sowie die daraus entstandenen Makrophagen (M ϕ) exprimieren die 12/15-LOX erst nach Stimulation mit den Th2-Cytokinen IL-4 oder IL-13 (Ivanov et al. 2015). In humanen neutrophilen Granulozyten konnte eine Induktion von Produkten der 15-LOX-1 durch Prostaglandin E₂ gezeigt werden (Levy et al. 2001). In frisch isolierten humanen PMN wird *Alox15* jedoch nicht exprimiert (Archambault et al. 2018).

Die physiologische Bedeutung der 12/15-LOX ist vielfältig: Das Enzym wurde 1975 erstmals in Retikulozyten von Kaninchen bei induzierter Anämie nachgewiesen (Schewe et al. 1975). Inzwischen sind zahlreiche Funktionen während der Hämatopoese sowie der Regulation von Entzündungsprozessen beschrieben. Ferner scheint sie bei der Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz und der Tumorgenese eine Rolle zu spielen (Uderhardt et al. 2012; Ivanov et al. 2015). Im Folgenden werden die verschiedenen Funktionen der 12/15-LOX genauer erläutert.

1.3.1 12/15-LOX und Hämatologie

Schewe und Kollegen wiesen 1975 eine Lipoxygenase nach, die die Membran von Mitochondrien lysieren konnte. So vermuteten sie eine Beteiligung des Enzyms am Abbau der Mitochondrien und somit eine Schlüsselfunktion in der Reifung von Erythrozyten (Krause et al. 1975; Schewe et al. 1975). Aus dem Isolat dieser Retikulozyten gelang schließlich im Jahr 1982 der Nachweis der Spezifizität dieses Enzyms (Bryant et al. 1982).

Die Generierung eines Knockout (KO) -Modells durch Sun und Funk im Jahr 1996 ermöglichte viele weitere Forschungsmöglichkeiten. Eine erste quantitative Analyse der hämatologischen Zellen zeigte keine signifikanten Unterschiede gegenüber Wildtyp (WT) Mäusen. So war die Zellzahl pro Mikroliter der Erythrozyten und Retikulozyten in *Alox15^{-/-}*

Mäusen gleich denen in WT Mäusen. Eine geringere Zellzahl der Leukozyten war nicht signifikant (Sun und Funk 1996).

Middleton und Kollegen beschrieben 2006 jedoch, dass *Alox15^{-/-}* Mäuse eine Neigung hatten, eine myeloproliferative Erkrankung zu entwickeln, aus der sich in vielen Fällen eine Leukämie entwickelte. Es zeigte sich u.a. eine Erhöhung der Zellzahl basophiler Granulozyten sowie eine erhöhte Lebensdauer und gesteigerte Zellteilungsaktivität myeloischer Zellen (Middleton et al. 2006).

Eine detaillierte Analyse der hämatologischen Funktion durch Kinder und Kollegen zeigte 2010 eine deutliche Störung der hämatologischen Funktion in *Alox15^{-/-}* Mäusen: Sie wiesen eine Reduktion der absoluten Zellzahl der Leukozyten nach, die vorwiegend auf eine Reduktion der B-Zellen und Monozyten zurückzuführen war. Dieser Defekt konnte auf eine zellautonome Störung hämatopoetischer Stammzellen zurückgeführt werden (Kinder et al. 2010).

Diese Veränderungen der hämatologischen Funktion in *Alox15^{-/-}* Mäusen wird jedoch kontrovers diskutiert (Pure und Kinder 2012; Taylor et al. 2012).

1.3.2 12/15-LOX in Entzündung

1.3.2.1 Beendigung einer Entzündungsreaktion

Um eine Entzündungsreaktion aufzulösen und zum Ursprungszustand (*restitutio ad integrum*) zurückzukehren, müssen eine Reihe von Prozessen stattfinden: Die Diapedese von PMN muss beendet, die Permeabilität der Gefäße reduziert, die Sekretion inflammatorischer Zellen gestoppt, Zelltrümmer und Entzündungszellen beseitigt und das Gewebe repariert werden. Gelingt dies nicht und ist eine Entzündungsreaktion inadäquat gesteigert, kann eine chronische Entzündung die Folge sein (Serhan 2010). Dies gefährdet auch den Organismus, denn chronische Entzündungsreaktionen spielen bei einer ganzen Reihe von Erkrankungen wie beispielsweise Asthma (Kay 1991), Atherosklerose (Libby 2002) und nicht zuletzt bei der Entstehung von etwa 25 % aller Malignome eine entscheidende Rolle (Parsonnet et al. 1991; Rosin et al. 1994; Ness und Cottreau 1999; Kawanishi et al. 2017). Dies macht deutlich, wie wichtig es für einen Organismus ist, Entzündungsprozesse nach der Elimination des Reizes schnell und zuverlässig aufzulösen.

Die Resolution einer Entzündungsreaktion wurde noch vor wenigen Jahrzehnten für einen passiven Vorgang gehalten, der auf die Eliminierung des auslösenden Agens und die anschließende Verdünnung und Inaktivierung proinflammatorischer Mediatoren zurückgeführt wurde (Robbins und Cotran 1979; Serhan et al. 2015b). Wenngleich diese Mechanismen eine Rolle spielen, hat durch die Entdeckung von Lipidmediatoren, die die Auflösung einer Entzündung aktiv beeinflussen, ein Paradigmenwechsel stattgefunden (Serhan et al. 2000; Serhan 2010). Die Konzentration dieser *Specialized Proresolving Lipid Mediators* (SPM) im Gewebe zeigt im Vergleich zu Leukotrienen und Prostaglandinen einen inversen zeitlichen Verlauf. Während einer selbstlimitierenden Entzündung kommt es zu einem Wechsel der Lipid-Mediator-Synthese von proentzündlichen zu proresolutorischen Lipidmediatoren. Dies ist u. a. auf die Induktion der 12/15-Lipoxygenase, einem Schlüsselenzym in der Synthese der SPM, durch Prostaglandine zurückzuführen. Der Beginn einer Entzündungsreaktion leitet also bereits ihr eigenes Ende ein (Levy et al. 2001; Wu et al. 2009).

1.3.2.2 Pro- und antientzündliche Produkte der 12/15-LOX

Specialized Proresolving Lipid Mediators leiten sich wie proinflammatorische Leukotriene und Prostaglandine von mehrfach ungesättigten Fettsäuren ab. Sie sind lokal wirkende Mediatoren, die aktiv Entzündungsreaktionen beenden (Buckley et al. 2014; Serhan 2017). SPM werden in vier Gruppen unterteilt: Lipoxine, Resolvine, Protectine und Maresine. Ihre Bezeichnung ist abhängig von der PUFA, von der sie abgeleitet sind sowie den an ihrer Synthese beteiligten Enzymen: Lipoxine sind von AA abgeleitet. Resolvine werden in E- und D-Resolvine unterteilt. E-Resolvine leiten sich von EPA, D-Resolvine wie auch Protectine und Maresine von DHA ab. Wenngleich die unterschiedlichen SPM unterschiedliche Zielzellen und Mechanismen beeinflussen, ist ihnen ihre antiinflammatorische und proresolutorische Wirkung gemein (Serhan 2017).

Die Bedeutung der 12/15-LOX in Entzündungsreaktionen beschränkt sich jedoch nicht auf die Produktion dieser SPM. Neben dieser antientzündlichen sind diverse proentzündliche Funktionen beschrieben. Die Vielschichtigkeit, mit der die 12/15-LOX an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt ist, lässt sich dadurch erklären, dass sie an der Synthese einer Vielzahl an Produkten mit ganz unterschiedlicher Funktion beteiligt ist. Die 12/15-LOX katalysiert die Dioxygenierung verschiedener Substrate, die im Anschluss wiederum

modifiziert werden können. Ob die pro- oder antientzündlichen Endprodukte überwiegen, scheint vom Gewebe bzw. von verschiedenen Kontextfaktoren abhängig zu sein (Ackermann et al. 2017; Singh und Rao 2019).

Eine Auswahl der pro- und antientzündlichen Effekte der 12/15-LOX sind in Tabelle 1 auf Seite 7 zusammengefasst.

Tabelle 1: Pro- und antientzündliche Effekte der 12/15-Lipoxygenase

Antientzündliche Effekte	Proentzündliche Effekte	
 Förderung der Wundheilung der Haut (Gronert et al. 2005) Reduktion der Entzündungsreaktion und des Gewebeschadens in Arthritis (Krönke et al. 2009) Förderung der Phagozytose apoptotischer Zellen (Uderhardt et al. 2012) Reduktion der Entzündung in ischämischem Hirngewebe (Sun et al. 2015) Verringerung der Neutrophilen Extravasation bei Ileus (Stein et al. 2016) 	 Verstärkte Infiltration der Herzmuskulatur durch Makrophagen (Kayama et al. 2009) Erhöhung der Empfänglichkeit für experimentelle Kolitis in Mäusen (Kroschwald et al. 2018) Aggravation von Asthma (Bradding et al. 1995) Induktion der Produktion proinflammatorischer Zytokine in hypoxischen Lungengefäßen (Li et al. 2013) 	
(Tabelle mod. nach Singh und Rao 2019)		

1.3.3 12/15-LOX und Autoimmunität

1.3.3.1 Autoimmunität

Autoimmunität beschreibt die Immunreaktion eines Organismus gegen sich selbst. Während jedes Individuum im Laufe des Lebens Antikörper (AK) oder T-Zellen bildet, die mit Autoantigenen reagieren, werden Autoimmunreaktionen unter normalen Umständen begrenzt. Ein gewisses Maß an Autoreaktivität ist sogar für die Entfernung von Zelltrümmern und pathologisch veränderten körpereigenen Zellen sinnvoll. Kommt es nun zu einem Versagen eines oder mehrerer Mechanismen, die die Immuntoleranz regulieren, können autoimmune Reaktionen zu Gewebeschäden führen. Chronifiziert sich die Schädigung des Gewebes, resultiert eine Autoimmunerkrankung (Rose und Bona 1993; Diamond und Lipsky 2018).

Für die Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz sind drei Mechanismen maßgeblich: Zunächst sind viele Autoantigene z. B. durch Zellmembranen vor Interaktionen mit dem Immunsystem geschützt. Außerdem wird die Unempfänglichkeit von Lymphozyten auf körpereigene Antigene bereits zentral u. a. im Thymus überprüft und Zellen, die eine zu hohe Reaktivität aufweisen, entfernt. Diese zentrale Toleranzbildung wird durch eine periphere Toleranzbildung in Lymphknoten ergänzt. Zuletzt sind zahlreiche regulatorische Zellen an der Limitierung potenziell überschießender Reaktionen beteiligt (Diamond und Lipsky 2018). Diese Mechanismen können sowohl durch endogene, z. B. veränderte Antigenpräsentation oder gestörte Entfernung apoptotischer Zellen, als auch durch exogene Faktoren, z. B. Rauchen oder molekulare Mimikry von Pathogenen, gestört werden. Da Autoimmunität nicht *per se* etwas Pathologisches ist, reicht es nicht aus, autoreaktive Lymphozyten oder AK nachzuweisen, um eine Erkrankung als Autoimmunerkrankung klassifizieren zu können. Zusätzlich muss u. a. eine Anreicherung autoreaktiver Zellen bzw. AK im geschädigten Gewebe sowie die Induktion des Gewebeschadens durch diese nachgewiesen werden. Wurde eine Erkrankung als Autoimmunerkrankung erkannt, kann sie nach verschiedenen Gesichtspunkten klassifiziert werden. So kann beispielsweise zwischen AK- und T-Zell- vermittelten sowie lokalen und systemischen Autoimmunerkrankungen unterschieden werden (Rose und Bona 1993; Silverstein 2014; Diamond und Lipsky 2018).

Inzwischen sind mehr als 80 Autoimmunerkrankungen bekannt, von denen etwa 4,5 % der Bevölkerung betroffen sind. Frauen sind mit einer Prävalenz von 6,4 % deutlich häufiger als Männer mit einer Prävalenz von 2,7 % betroffen (Hayter und Cook 2012)

1.3.3.2 Die Bedeutung der 12/15-LOX für den Erhalt der immunologischen Toleranz

Die 12/15-LOX scheint über verschiedene Mechanismen an der Regulation der immunologischen Toleranz beteiligt zu sein. Während einer Entzündung sind es vor allem die geweberesidenten, alternativ aktivierten Makrophagen (ResMø) und nicht die inflammatorischen Makrophagen, die die 12/15-LOX exprimieren. 12/15-LOX-abhängig wird das Phospholipid Phosphatidylethanolamin (PE) oxidiert und auf der Zellmembran der ResMø präsentiert (Uderhardt et al. 2012).

Apoptotische Zellen präsentieren Phosphatidylserin (PS) auf ihrer Membran. Dies kann unter anderem vom milk *fat globule-EGF factor 8* (MFG-E8), das von inflammatorischen M¢ exprimiert wird, gebunden werden. Allerdings bindet auch das von ResM¢ exprimierte *T-Cell Membrane Protein* 4 (Tim-4) PS. Oxidiertes PE bindet nun ebenfalls MFG-E8 und fungiert somit als kompetitiver Antagonist. Dies hat zur Folge, dass 12/15-LOX-abhängig die Aufnahme apoptotischer Zellen vorwiegend durch ResM¢ erfolgt. An 12/15-LOXgendefizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Störung dieses Mechanismus

zum Bruch der immunologischen Toleranz und der Entwicklung eines Lupus-ähnlichen Krankheitsbildes führt (Uderhardt et al. 2012).

Die 12/15-LOX beeinflusst die immunologische Toleranz weiterhin über die Reifung der dendritischen Zellen (DC, von engl. *Dendritic Cells*) (Rothe et al. 2015): Nachdem dendritische Zellen Pathogen-assoziierte molekulare Muster erkannt haben, werden diese aktiviert und vermitteln eine T-Zell-Antwort. Diese Antwort muss jedoch streng kontrolliert erfolgen, da eine gesteigerte Aktivierung zu autoreaktiven T-Zellen führt (Ganguly et al. 2013).

Die Oxidierung von Phosphatidylcholin durch die 12/15-LOX führt in DC zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NRF2. Die Genprodukte, die NRF2-vermittelt synthetisiert werden, vermitteln ihrerseits eine Inhibierung der Reifung von DC. So zeigen dendritische Zellen, in denen die 12/15-LOX ausgeschaltet ist, sowohl im Menschen als auch in der Maus eine beschleunigte Reifung und eine Veränderung ihres Zytokin-Profils. Dadurch begünstigen sie eine Differenzierung zu Th17-Zellen. *Alox15* Knockout-Mäuse (*Alox15^{-/-}*) zeigen nicht nur eine gesteigerte Th17-Differenzierung, sondern auch eine Zunahme der Krankheitsaktivität in Th17-abhängigen Autoimmunerkrankungen (Emerson und LeVine 2004; Rothe et al. 2015).

Dahingegen zeigte eine Untersuchung von McDuffie und Kollegen 12/15-LOX-abhängig eine gesteigerte Anfälligkeit von NOD-Mäusen (von engl. *Non-Obese Diabetic Mouse*) gegenüber autoimmunem Diabetes mellitus (McDuffie et al. 2008). Die NOD-Maus ist aufgrund der hohen Inzidenz von spontanem autoimmunem Diabetes ein etabliertes Modell für die Erforschung des Typ-1-Diabetes (Leiter et al. 1987; Atkinson und Leiter 1999). NOD-Mäuse, in denen das *Alox15* Gen ausgeschaltet ist, sind jedoch vor der Entwicklung von autoimmunem Diabetes geschützt (McDuffie et al. 2008).

Ähnlich der vielfältigen Funktion der 12/15-LOX in Entzündungen lässt sich ihre Bedeutung für den Erhalt der immunologischen Toleranz nicht eindeutig definieren. Vielmehr scheinen auch hier kontextabhängig Faktoren eine Rolle zu spielen.

1.4 Neutrophile Granulozyten in 12/15-Lipoxygenase-gendefizienten Mäusen

In bisher nicht veröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe wurden PMN aus 12/15-Lipoxygenase-gendefizienten Mäusen mit denen von Wildtyp Mäusen im

Durchflusszytometer verglichen. Wie in Abbildung 1 zu erkennen zeigte sich, dass 12/15-LOX-defiziente PMN nicht wie WT PMN eine distinkte Population bildeten: Wurde das Vorwärtsstreulicht (FSC, von engl. *Forward Scatter*) gegenüber dem Seitwärtsstreulicht (SSC, von engl. *Side Scatter*) dargestellt, zeigte sich eine Subpopulation mit einem höheren Signal im SSC, die etwa ein Drittel bis ein Viertel der gesamten PMN ausmachte. In funktionellen Untersuchungen zeigte sich zudem, dass die Effektorfunktion der PMN der *Alox15^{-/-}* Mäuse gesteigert ist.



Abbildung 1: *Alox15^{-/-}* **PMN sind morphologisch verändert** PMN wurden aus dem Knochenmark aufgereinigt und im Durchflusszytometer im FSC x SSC beurteilt. Links Wildtyp PMN, rechts *Alox15^{-/-}*

1.5 Ziel der Arbeit

Die 12/15-Lipoxygenase beeinflusst, wie oben dargestellt, verschiedene Organsysteme. Leukozyten scheinen sowohl während ihrer Entstehung im Zuge der Hämatopoese als auch in ihrer Funktion z. B. als Effektorzellen in Entzündungsreaktionen durch die 12/15-LOX beeinflusst zu werden.

Dennoch lassen sich über die endogene Funktion der 12/15-LOX in neutrophilen Granulozyten bisher nur wenige Informationen finden. So ist beispielsweise eine Subpopulation der *Alox15^{-/-}* PMN bisher nicht beschrieben.

Ziel der Arbeit ist es, aufbauend auf den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe PMN in 12/15-LOX-gendefizienten Mäusen nach morphologischen und funktionellen Gesichtspunkten zu charakterisieren. Im Einzelnen sind folgende Ziele Gegenstand dieser Arbeit:

- 1. *In vitro* Charakterisierung der Subpopulationen von *Alox15^{-/-}* PMN nach morphologischen und funktionellen Gesichtspunkten
- 2. Überprüfung der Funktionalität von *Alox15^{-/-}* PMN *in vivo* anhand eines prototypischen Modells einer Neutrophilen-abhängigen Entzündungsreaktion

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Eine Liste mit allen verwendeten Materialien befindet sich im Anhang unter 7.1 auf S. 79 ff..

2.2 Mäuse

C57Bl/6J, B6.SJL-*Ptprc^a Pepc^b*/BoyJ (kongen für CD45.1 Allel) (Shen et al. 1985), B6.129S2-*Alox15^{tm1Fun}/*J (*Alox15^{-/-}*) (Sun und Funk 1996) und B6.Cg-Tg(S100A8-cre,-EGFP)1Ilw/J (MRP8-Cre) wurden von Jackson Laboratory, *Alox15^{tm1a(KOMP)Mbp}* (*Alox15* tm1a Knockout First) wurden von KOMP erworben. Alle kongenen Stämme hatten einen C57Bl/6J Hintergrund. Die Haltung der Tiere erfolgte in Räumen mit kontrollierter Temperatur und zwölf Stunden Tag-Nacht-Rhythmus in den Räumlichkeiten der Tierhaltung der Universität zu Lübeck. Die Abwesenheit spezifischer Pathogene wurde regelmäßig durch Reportermäuse überprüft. Die Fütterung und Wasserversorgung erfolgte *ad libitum*. Die Versuche wurden nach geltendem Tierschutzgesetz von ausgebildetem und zertifiziertem Personal durchgeführt. In allen Experimenten wurden 6-15 Wochen alte Mäuse mit alterund geschlechtsangepassten Kontrollen verwendet.

2.3 Methoden

2.3.1 Teil 1: Morphologische und funktionelle *in vitro* Charakterisierung der Subpopulationen neutrophiler Granulozyten in 12/15-Lipoxygenasegendefizienten Mäusen

2.3.1.1 Durchflusszytometrie

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie (FC, von engl. *Flow Cytometry*) ist eine in den 1960er Jahren entwickelte Technik, die es ermöglicht, in kurzer Zeit Zellzahl sowie physikalische und chemische Eigenschaften von Zellen und Partikeln zu messen (Bakke 2001; Shapiro 2003a). Die Zellen durchlaufen in einer isotonischen Trägerflüssigkeit in einem annähernd laminaren Strom einzeln die Messküvette und werden hier mit monochromatischem Licht bestrahlt (Brown und Wittwer 2000). In Abhängigkeit der Wellenlänge des Lasers, der Strukturen innerhalb eines Partikels sowie dessen Größe und Brechungsindex wird das Licht unterschiedlich stark gebeugt und gestreut (Bakke 2001; Shapiro 2003e). Das Vorwärtsstreulicht wird durch einen Detektor, der in einem spitzen Winkel (0,5-20°) zum Strahl des Lasers steht, gemessen. Die Intensität des FSC ist vor allem von der Beugung des Lichts durch die Partikel bzw. Zellen abhängig, die wiederum annähernd mit der Größe korreliert (Bakke 2001; Shapiro 2003e; Shapiro 2003b). Die restlichen Detektoren stehen in etwa einem rechten Winkel zum Strahl des Lasers. Die Intensität des Seitwärtsstreulichts ist vor allem von den inneren Strukturen der Partikel bzw. Zellen abhängig. So wird das Licht beispielsweise in Zellen mit komplexen inneren Strukturen oder starker Granulation stärker gestreut, was eine höhere Intensität im SSC zur Folge hat. Deutlich wird dies bei der Analyse weißer Blutzellen, die eine typische Aufteilung in einem FSC-SSC-Graphen haben (Brown und Wittwer 2000; Bakke 2001; Shapiro 2003e; Bio-Rad Laboratories 2016).

Passiert eine annähernd kugelförmige Zelle nun den Laser, so steigt die Intensität des Signals zu Beginn an, erreicht den Höhepunkt, wenn sich die Zelle in der Mitte des Lasers befindet und fällt daraufhin wieder ab. Eine Funktion der Intensität des Signals im FSC oder SSC über die Zeit stellt sich demzufolge parabelförmig dar. Hieraus lassen sich nun die Fläche, die Höhe und die Breite der Funktion bestimmen (Bio-Rad Laboratories 2016). Dies lässt sich wiederum nutzen, um Zellen, die aneinanderhaften und die Ergebnisse verfälschen können (Dubletten) aus der Analyse auszuschließen. So haben Dubletten im Vergleich zu den übrigen Zellen eine vergrößerte Fläche unterhalb der Kurve (Shapiro 2003f; Shapiro 2003c).

Daher wurden bei allen Versuchen die Werte SSC_{Fläche} und SSC_{Höhe} gegeneinander aufgetragen. Wies SSC_{Fläche} gegenüber SSC_{Höhe} im Vergleich zu den restlichen Zellen eine Abweichung nach oben aus, wurden die Zellen aus der Analyse ausgeschlossen.

Die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der FC ergeben sich aber nicht nur aus dem FSC und SSC, sondern insbesondere aus der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen und fluoreszenzmarkierten Antikörpern, mit denen eine Vielzahl intra- und extrazellulärer Bestandteile markiert und untersucht werden können. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden von einem Laser angeregt und geben dann unter Energieverlust Licht einer größeren Wellenlänge ab (Bio-Rad Laboratories 2016). Jeder Fluoreszenzfarbstoff hat dabei ein spezifisches Spektrum. Das emittierte Licht wird nun mithilfe dichroitischer Spiegel und Filter in Abhängigkeit der Wellenlänge aufgespalten und von Detektoren, meist Photomultiplier, detektiert und in elektrische Spannung umgewandelt. Bestenfalls kann das emittierte Licht eines Fluoreszenzfarbstoff von genau einem Detektor nachgewiesen

werden. Da sich die Fluoreszenzfarbstoffe jedoch in ihren Spektren teilweise überschneiden, muss ggf. eine mathematische Korrektur der Signalintensitäten, eine Kompensation, durchgeführt werden. Diese geht jedoch mit einer gewissen Reduktion der Datenqualität einher. Je mehr Farbstoffe verwendet werden und je näher deren Spektren beieinander liegen, desto mehr muss kompensiert werden und desto schlechter ist die Datenqualität. Auf der anderen Seite werden erst durch die Verwendung verschiedener Marker komplexe Untersuchungen möglich (Brown und Wittwer 2000; Shapiro 2003c; Shapiro 2003g; Bio-Rad Laboratories 2016).

Bei jedem neuen Protokoll wurde eine solche Kompensation mithilfe der automatisierten Kompensation des MACSQuant durchgeführt. Hierzu wurden die untersuchten Zellen ohne Fluoreszenzfarbstoff, Singlets (Zellen, die mit jeweils nur einem verwendeten Farbstoff gefärbt werden) und FMOs (engl. *Fluorescence Minus One* – Zellen, die mit allen verwendeten Farbstoffen außer einem gefärbt werden) angefertigt. Vor jeder weiteren Wiederholung des Versuchs wurde anhand dieser Kontrollen die Kompensation überprüft und ggf. angepasst.

Eine weitere Anwendung einiger Durchflusszytometer ergibt sich aus der Möglichkeit, Zellen anhand vorher festgelegter Charakteristika zu sortieren. Die meisten dieser fluoreszenzaktivierten Zellsortierer (FACS, von engl. *Fluorescence Activated Cell Sorter*) arbeiten vereinfacht nach folgendem Prinzip: Nachdem die Zellen den Laser passiert haben, wird die Flüssigkeit durch hochfrequente Vibration in Schwingungen versetzt, woraufhin der Strahl abbricht und sich Tröpfchen bilden. Kurz bevor der Strahl abbricht, kann elektrische Spannung angelegt werden, die eine positive oder negative Oberflächenladung hervorruft. Die Tröpfchen behalten diese Ladung auch nach Abbruch und können so durch positiv bzw. negative geladene Platten in eine gewünschte Richtung abgelenkt werden (Hulett et al. 1969; Shapiro 2003d; Bio-Rad Laboratories 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die FC zur Zellzyklusanalyse im Rahmen eines Phagozytoseassays, zur Überprüfung des Transplantationserfolg nach KM-Transplantation sowie zur quantitativen Analyse von Leukozyten verwendet. Ferner kam die FACS zur Isolierung zweier Neutrophilenpopulationen zum Einsatz.

2.3.1.2 Isolierung von murinem Knochenmark

Die Isolierung von murinem KM erfolgte sowohl für die Knochenmarkschimären als auch für die Isolierung von neutrophilen Granulozyten in Anlehnung an das Protokoll von Swamydas und Lionakis (Swamydas und Lionakis 2013). Die Mäuse wurden größenadaptiert mit 150-200 μl Ketamine/Xylazin (Ketamin 10 mg/ml, Xylazin 1,5 mg/ml) intraperitoneal anästhesiert und durch eine zervikale Dislokation getötet. Daraufhin wurde die Haut über dem Peritoneum durch einen senkrechten Schnitt durchtrennt. Von dort wurden die unteren Extremitäten freigelegt. Nach Entfernung der Haut wurde mit einer Schere die Muskulatur an der Hüfte durchtrennt und der Femurkopf aus dem Acetabulum gelöst, ohne dabei das Femur zu beschädigen. Anschließend wurde die Pfote vorsichtig am oberen Sprunggelenk entfernt und Femur und Tibia in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, von engl. Phosphate-Buffered Saline) (wenn nicht anders angegeben, wurde 1x PBS pH 7,2 verwendet) in Raumtemperatur (RT) gelegt. Alle weiteren Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Muskulatur wurde von den Knochen behutsam mit einem Skalpell abgelöst und Femur und Tibia am Kniegelenk voneinander getrennt. Die Epiphysen der Knochen wurden abgetrennt. Mit einer 26 G Kanüle wurde das KM in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gespült. Hierfür wurde bei dem Knochenmarkschimären steriles PBS und für die Isolierung von PMN MACS-Puffer (PBS ergänzt mit 0,5 % Rinderserumalbumin (BSA, von engl. Bovine Serum Albumin) und 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)) verwendet.

2.3.1.3 Isolierung von PMN aus murinem Knochenmark

Neutrophile Granulozyten wurden aus dem Femur und der Tibia 8-12 Wochen alter Mäuse mit Hilfe des Neutrophilen-Isolierungs-Kit entsprechend der Anweisungen des Herstellers isoliert: Es wurde auf Eis und unter sterilen Kautelen gearbeitet. Die Suspension mit den Zellen des KMs wurde bei 400 G und 4 °C für 4 Minuten zentrifugiert. (Soweit nicht anders vermerkt, wurden diese Einstellungen zur Zentrifugation verwendet.) Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 1000 μ l MACS-Puffer resuspendiert und in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Anschließend wurden die Zellen durch ein 30 μ m-Zellsieb gegeben, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten und die unspezifische Bindung von Antikörpern zu verringern. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert und je 50 x 10⁶ Zellen in 200 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Das weitere Procedere bezieht sich auf 50 x 10⁶ angepasst. Hierzu wurden 50 µl des Neutrophil-Biotin-Antikörper-Cocktails hinzugegeben, der Nicht-Zielzellen mit Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörpern markiert. Diese Suspension wurde bei 4 °C zehn Minuten inkubiert, dann mit 5 ml MACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 400 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Markierung mit magnetischen anti-Biotin-Micro-Beads erfolgte analog, wobei abweichend 100 µl der Micro-Beads hinzugegeben wurden und über 15 Minuten inkubiert wurde. Im Anschluss wurden die Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die magnetische Trennungssäule wurde zunächst mit 500 µl MACS-Puffer vorbereitet. Daraufhin wurden die Zellen hinzugefügt und die Säule mit einem Milliliter MACS-Puffer gespült, um eine möglichst hohe Ausbeute zu erhalten. Um die Reinheit und den Anteil lebender PMN zu bestimmen, wurden die Zellen mit PerCP-konjugierten-anti-Maus-LyGG und APC-Vio770-konjugierten-anti-Maus-CD11b-AK 1:10 gefärbt und anschließend gewaschen. Daraufhin wurde DAPI 1:1000 hinzugefügt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die prozentualen Anteile Ly6G⁺/CD11b⁺-Zellen sowie der Anteil toter Zellen bestimmt.

2.3.1.4 Isolierung von Alox15^{-/-} SSC^{high} and Alox15^{-/-} SSC^{low} PMN

Die frisch vom KM isolierten PMN wurden mit PerCP-konjugierten-anti-Maus-Ly6G-AK (1:10 in MACS-Puffer) gefärbt und anschließend ausgiebig gewaschen. Die Konzentration der Suspension wurde auf 20 x 10^6 Zellen pro Milliliter in MACS-Puffer angepasst und auf Eis gelagert. Die Zellen wurden mit dem Durchflusszytometer BD FACSAria II in zwei Populationen unterteilt. Hierzu wurden zunächst Einzelzellen berücksichtigt und ein Gate um die Granulozyten-Population gezogen. Diese Zellen wurden dann weiter in Ly6G⁺- und Ly6G⁻-Zellen unterteilt. Die Ly6G⁺-Zellen wurden anhand ihrer Charakteristik im FSC und im SSC in eine Population mit einem hohen Signal (SSC^{high}) und eine Population mit einem niedrigen Signal im SSC (SSC^{low}) sortiert. Die Zellen wurden bei 4 °C durch ein 70 µm Nozzle gespült und in mit MACS-Puffer vorbereiteten Röhrchen gesammelt. Innerhalb von 30 Minuten konnten bis zu 2×10^6 SSC^{low}- und / oder SSC^{high}-Zellen sortiert werden. Anschließend wurde ein kleiner Anteil dieser Zellen mit 0,2 % Trypanblau angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop auf Vitalität getestet.

2.3.1.5 ROS-Freisetzungs-Assay

Während des Respiratory Bursts katalysiert die NADPH-Oxidase die Reduktion von molekularem Sauerstoff zum Superoxidanion unter Verbrauch von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) (Babior et al. 1973; Suzuki und Lehrer 1980). Zwei Superoxidanionen können nun spontan oder katalysiert durch die Superoxiddismutase (SOD) mit zwei Protonen zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und molekularem Sauerstoff reagieren. Die in den azurophilen Granula von PMN vorkommende Myeloperoxidase kann H₂O₂ zu noch aggressiveren Molekülen wie hypochlorige Säure umwandeln (Klebanoff 2005). Diese ROS können durch eine Chemolumineszenz-Reaktion mit Luminol und Lucigenin nachgewiesen werden. Während die Fluoreszenz von Luminol als Surrogatparameter sowohl für die intra- als auch die extrazelluläre ROS-Freisetzung dient (Briheim et al. 1984), dringt Lucigenin nicht in die Zelle ein und gibt daher nur Auskunft über die extrazelluläre ROS-Produktion (Aitken et al. 1992).

Um die Freisetzung von ROS zu bestimmen, wurde das Ausmaß der Chemilumineszenz von und Lucigenin in Abhängigkeit der Stimulierung der Zellen Luminol mit Immunkomplexen (IK) und/oder Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) gemessen. Der Wert der Chemilumineszenz wurde in relativen Lichteinheiten (RLU, von engl. Relative Light Unit) angegeben. Die fixierten IK wurden, wie zuvor von Sezin und Kollegen beschrieben, angefertigt (Sezin et al. 2017): Eine stark bindende 96-Mikrotiterplatte wurde mit 10 mg/ml Humanalbumin (HSA, von engl. Human Serum Albumin) in Coating-Puffer (50 nM Carbonat/Bicarbonat in destilliertem Wasser, pH 9,6) über Nacht inkubiert. Daraufhin wurde die Platte drei Mal gewaschen und anschließend eine Stunde mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS, von engl. Fetal Calf Serum) in PBS geblockt. Erneut wurde die Platte gründlich gewaschen und mit Kaninchen-anti-HSA-Antikörpern (1:400 in PBS) vier Stunden inkubiert. PBS wurde als Negativkontrolle verwendet. In der Zwischenzeit wurden, wie oben beschrieben, Neutrophile von WT und Alox15^{-/-} Mäusen isoliert und in SSC^{high} und SSC^{low} Populationen sortiert. Die PMN wurden in CL-Medium (1 % FCS, 25mM HEPES und 0,2 mg/ml Glucose in RPMI-Puffer) resuspendiert und die Konzentration auf 1,25 x 10⁵ Zellen pro Milliliter angepasst. Nun wurden entweder 1 µM Lucigenin oder 0,5 mM Luminol und in die entsprechenden Proben 100 nM PMA oder als Negativkontrolle das entsprechende Volumen Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugefügt. 200 μl dieser Suspension wurden in die entsprechenden Näpfchen der mit IK beschichteten 96-Mikrotiterplatte gegeben. Jede Probe wurde auf zwei Näpfchen mit und zwei Näpfchen ohne IK verteilt. Die Platte wurde bei 37 °C im Infinite M200 PRO ELISA Reader inkubiert und das emittierte Licht von Luminol und Lucigenin als Indikator für die ROS-Freisetzung über zwei Stunden gemessen. Anschließend wurde die Fläche unterhalb der Kurve (AUC, von engl. *Area Under the Curve*), die die Chemilumineszenz im Zeitverlaufs darstellt, ermittelt und normalisiert. Hierzu wurde die AUC der WT-Probe ohne Stimulation bei jeder unabhängigen Wiederholung des Experiments als 0 und die AUC der WT-Probe mit Stimulation durch IK und/oder PMA als 1 definiert:

$$AUC_{normalisiert} = \frac{AUC_{Probe} - AUC_{WTnicht \, stimuliert}}{AUC_{WTstimuliert} - AUC_{WTnicht \, stimuliert}}$$

2.3.1.6 NETosis-Assay

NETs wurden mittels immunfluoreszierender Darstellung von Nukleinsäuren, Histonen und Myeloperoxidase (MPO) dargestellt. Das Vorgehen entsprach mit leichten Modifikationen dem von Brinkmann und Kollegen (Brinkmann et al. 2010): SSC^{high} und SSC^{low} PMN wurden, wie oben dargestellt, isoliert und die Konzentration auf 1 x 10⁶ Zellen pro Milliliter in HBSS-Puffer angepasst. 200 μ l dieser Suspension wurden mit 1 μ M PMA versetzt, in mit einem Dako-Stift markiertem Bereich eines Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträger pipettiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ drei Stunden inkubiert. DMSO diente als Negativkontrolle. Nach Abwaschen mit PBS erfolgte die Fixierung der Zellen mittels 4 % Paraformaldehyd und erneutes Abwaschen. Zur Permeabilisierung erfolgte die Inkubation in Methanol für weitere zehn Minuten bei -20 °C. Nach Abwaschen in PBST (0,05 % Tween in PBS) erfolgte die Blockade unspezifischer Bindungsstellen mittels Blockpuffer (5 % Normal Donkey Serum in PBST) für eine Stunde bei RT. Nach erneutem Abwaschen wurden Histone und MPO sequenziell dargestellt. Zunächst erfolgte die Markierung von Histonen mittels des Maus-anti-H3-Antikörpers. Dieser wurde im Verhältnis 1:100 in Blockpuffer gelöst. Die Antikörperbindung geschah über Nacht bei 4 °C. Nach Abwaschen erfolgte die Inkubation mittels des fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpers (Esel-anti-Maus-IgG-Alexa-Fluor-488-AK) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Der Sekundärantikörper wurde zuvor 1:500 in Blockpuffer gelöst. Nach erneutem Abwaschen erfolgte die Markierung der Myeloperoxidase wobei abweichend mit analog, einer Konzentration des Primärantikörpers (Kaninchen-anti-MPO-AK) von 1:200 und einer Inkubationszeit von einer Stunde gearbeitet wurde. Nach Inkubation im entsprechenden Sekundärantikörper (Eselanti-Kaninchen-IgG-Alexa-Fluor-594-AK) wurden die Proben erneut mit Waschpuffer gewaschen und jede Probe sodann mit 20 µl DAPI Fluoromount-G zur Darstellung der Nukleinsäuren versetzt. Die Objektträger wurden mit einem Deckglas versehen und bis zur Auswertung bei -20°C gelagert. Unter einem Keyence Mikroskop wurden die NETs mithilfe der BZ-II Analyzer Software ausgewertet, indem bei einer 200 x Vergrößerung die durchschnittlichen NETs pro Gesichtsfeld aus zehn zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern ermittelt wurden.

2.3.1.7 Transmissionselektronenmikrospkopie

Um die innere Struktur der verschiedenen Neutrophilen-Populationen zu analysieren, wurden Bilder mit einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) angefertigt. Da die maximale Auflösung eines Mikroskops proportional zur Wellenlänge der verwendeten Strahlung ist, ist die Auflösung eines konventionellen Lichtmikroskops auf etwa 200 nm begrenzt (van Putten et al. 2011; Michler 2019). Aufgrund der wesentlich kürzen Wellenlänge eines Elektronenstrahls, kann mit einem Elektronenmikroskop eine deutlich höhere Auflösung erzielt werden. Der grundlegende Aufbau eines TEM ist analog zu dem eines Lichtmikroskops: Eine Elektronenkanone dient als Quelle des Elektronenstrahls und gibt die Elektronen je nach Einsatzgebiet mit einer Beschleunigungsspannung zwischen etwa 100 und 3000 keV ab. Da die Elektronen bereits durch Atome der Luft abgelenkt werden und Energie verlieren, ist die Herstellung eines Vakuums notwendig. Elektromagnetische Spulen üben einen mit Glaslinsen vergleichbaren Effekt auf die Elektronen aus und dienen sowohl als Kondensor als auch der Vergrößerung. Trifft ein Elektron nun auf die Probe, kann es entweder abgelenkt werden oder auf geradem Wege die Probe durchdringen. Dabei steigt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Elektron abgelenkt wird, mit der Anzahl und Ordnungszahl der Atome, die es passieren muss. Eine mit einem Fluoreszenzschirm verbundene CCD-Kamera kann nun entweder die abgelenkten (Dunkelfeld) oder die nicht abgelenkten Strahlen (Hellfeld) messen. Da die Probe im Gegensatz zur Rasterelektronenmikroskopie elektronendurchlässig sein muss, ist eine Vorbereitung in 5 – 100 nm dicke Schnitte erforderlich (Reimer und Kohl 2008; Michler 2019).

SSC^{high} und SSC^{low} PMN wurden, wie oben dargestellt, isoliert und sortiert. 1 x 10⁶ Zellen wurden in 1 ml Fixierungspuffer (2 % Glutaraldehyd, 0,6 % Paraformaldehyd, 0,03 %

Kalziumchlorid in 0,06 M Natrium-Cacodylatpuffer) fixiert und anschließend bei 1000 G zentrifugiert. Der Fixierungspuffer wurde uns durch das Institut für Anatomie zur Verfügung gestellt. Auch die weiteren Schritte erfolgten in diesem Institut. Die Zellen wurden 30 Minuten in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer gespült und anschließend zwei Stunden in 2 % Osmiumtetroxid osmiert. Erneut wurden sie in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer gespült und danach für jeweils 30 Minuten in folgenden Ethanolverdünnungen entwässert: 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 100 %, 100 %. Eine einstündige Inkubation in Propylenoxid führte zu einer anschließend besseren Löslichkeit des wasserunlöslichen Harzes. Die Einbettung der Zellen in Araldit, ein Epoxidharz, erfolgte durch zweitägige Aushärtung bei 60 °C. Der entstandene Block wurde mit einem Diamantmesser in 70 - 90 nm dicke Schnitte geschnitten und mit einem Kontrastierungsautomaten kontrastiert. Die Kontrastierungszeiten betrugen 30 Minuten in 0,5 % Uranylacetat bei 40 °C sowie 7 Minuten in 3 % Bleicitrat bei 20 °C. Anschließend erfolgte die Auswertung der Schnitte am JEM-1011 Elektronenmikroskop der Firma Jeol.

2.3.1.8 Phagozytose-Assay

Um die Phagozytoseaktivität zu bestimmen, wurde mit wenigen Veränderungen nach der Beschreibung von Cayman Chemical vorgegangen (Cayman Chemical): SSC^{high} und SSC^{low} PMN wurden, wie oben dargestellt, isoliert, sortiert und die Konzentration auf 5 x 10⁵ Zellen pro Milliliter in CL-Medium angepasst. Als zu phagozytierende Partikel wurden Latexpartikel verwendet, die mit FITC-konjugiertem-Immunglobulin G beschichtet sind. Diese Beschichtung mit Immunglobulin G (IgG) imitiert die Opsonierung von Partikeln. Die Latexpartikel wurden in einer finalen Konzentration von 1:400 hinzugegeben und die PMN mit 100 nM PMA stimuliert. Als Kontrolle wurden Latexpartikel ohne Zellen, Zellen ohne Latexpartikel sowie Zellen mit Latexpartikel und DMSO verwendet. Von dieser Suspension wurden je 200 μ l in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ drei Stunden inkubiert. Nachdem die Zellen vier Minuten bei 400 G und RT zentrifugiert wurden, wurden sie in 300 µl Assay-Puffer resuspendiert. Um zwischen phagozytierten und adsorbierten Latex Partikeln zu unterscheiden, wurden die PMN eine Minute mit 0,4 % Trypanblau bei RT inkubiert und anschließend mit Assay-Puffer gewaschen. Abgestorbene Zellen wurden mit DAPI (1:1000 in Assay-Puffer) gefärbt. Mit Hilfe des MACSQuant Durchflusszytometers wurde nach Ausschluss toter Zellen und Dubletten der prozentuale Anteil phagozytierender PMN anhand des FITC-Signals ermittelt. Die in der FC ermittelten Daten wurden mithilfe von FlowJo ausgewertet und anschließend normalisiert. Hierzu wurde der Prozentwert phagozytierender Zellen der WT-Probe ohne Stimulation bei jeder unabhängigen Wiederholung des Experiments als 0 und der Prozentwert phagozytierender Zellen der WT-Probe mit Stimulation durch IK und/oder PMA als 1 definiert:

$$Phagozytoserate_{normalisiert} = \frac{\%_{Probe} - \%_{WTnicht \, stimuliert}}{\%_{WTstimuliert} - \%_{WTnicht \, stimuliert}}$$

2.3.1.9 Zell-Zyklus-Analyse

Für die Analyse des Zellzyklus wurde DNS mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt und von der Signalintensität in der FC auf die Menge der DNS und somit auf die Phase im Zellzyklus geschlossen. Zur Kalibrierung und Kontrolle wurden monoklonale Jurkat Zellen verwendet.

2.3.1.9.1 Kultur Jurkat Zellen

10-50 x 10⁶ Jurkat Zellen (Klon E6-1, ATCC TIB 152) wurden in 50 ml Kulturmedium (0,01M HEPES, 1x Penicillin/Streptomycin und 5 % FCS in RPMI-Puffer) bei 37 °C und 5 % CO₂ in 175 cm² Zellkulturflaschen unter sterilen Bedingungen kultiviert. Nach 2-3 Tagen wurde das Medium ausgewechselt. Hierzu wurden die Zellen ebenfalls unter sterilen Bedingungen mit serologischen Pipetten in 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 130 G und 24 °C vier Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Nachdem die Jurkat Zellen auf 10 x 10⁶ Zellen reduziert wurden, schloss sich eine Waschung mit vorgewärmten PBS an. Erneut wurden die Zellen zentrifugiert, in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen gegeben.

2.3.1.9.2 Assay

Um die prozentuale Aufteilung der Zellen in die verschieden Phasen des Zellzyklus zu untersuchen, wurde mit wenigen Modifikationen nach der Beschreibung von Pozarowski und Darzynkiewicz bzw. Miltenyi Biotec vorgegangen (Miltenyi Biotec; Pozarowski und Darzynkiewicz 2004): PMN oder Jurkat-Zellen wurden, wie oben ausführlich beschrieben, isoliert bzw. sortiert und gründlich mit Probenpuffer (1 g/l Glucose in PBS) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und 10 x 10⁶ Zellen pro Milliliter in Probenpuffer gelöst. Von dieser Suspension wurden 100 µl in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Während das Zentrifugenröhrchen auf einem Vortexmischer geschüttelt wurde, wurde langsam ein Milliliter etwa 0 °C kaltes,

70 prozentiges Ethanol hinzugegeben. Die Permeabilisierung durch das Ethanol erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen bei 700 G und 4 °C zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Die Resuspendierung erfolgte in einem Milliliter Färbelösung (100 μl DAPI und 0,1 % Triton X-100 in 10 ml Probenpuffer). Diese Suspension wurde bei RT 40 Minuten unter stetiger Bewegung auf einem Röhrchenroller inkubiert und danach auf Eis gelagert. Innerhalb von 24 Stunden erfolgte die Messung am MACSQuant Durchflusszytometer: Nach Ausschluss von Zelltrümmern und Dubletten wurde der V1-Kanal linear dargestellt und die prozentuale Verteilung des DNS-Gehalts bestimmt. Die Auswertung der Durchflusszytometriedaten erfolgte mit FlowJo.

2.3.1.10 Statistik

Die nicht normalverteilten Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test ausgewertet. Anschließend schloss sich eine Korrektur der Alphafehler-Kumulierung mit Hilfe des Dunns Post-hoc Tests an. Werte wurden als statistisch signifikant gewertet, wenn der p-Wert ≤ 0,05 betrug. Alle Daten wurden mit GraphPad Prism ausgewertet.

2.3.2 Teil 2: Funktionelle *in vivo* Charakterisierung neutrophiler Granulozyten in 12/15-Lipoxygenase-gendefizienten Mäusen

Um die Funktion der PMN *in vivo* zu untersuchen, verwendeten wir als Neutrophilen-abhängiges Entzündungsmodell experimentelle Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) (Sitaru et al. 2002a). Der Versuchsaufbau mit Knochenmarkchimären ermöglichte zudem eine Beurteilung des Einflusses radioresistenter WT Zellen auf die hämatologischen *Alox15^{-/-}* Zellen und *vice versa*.

Im Folgenden werden zunächst Grundlagen zu EBA sowie zu den verschiedenen EBA-Modellen betrachtet. Anschließend werden die Methoden zur Aufreinigung des erforderlichen IgGs sowie die Vorgehensweise zur Generierung von Chimären und der Ablauf des Experiments dargestellt.

2.3.2.1 Epidermolysis bullosa acquisita

Epidermolysis bullosa acquisita ist eine erworbene Autoimmunerkrankung, die die Haut und Schleimhäute befällt. Ihr liegt die Bildung gegen Kollagen VII (COL7) gerichteter IgG zugrunde. Diese führen zu einer subepidermalen Blasenbildung (Woodley et al. 1984; Culton et al. 2014). Mit einer Inzidenz von etwa 0,2 – 0,5 neuen Fällen auf eine Million Einwohner und Jahr handelt es sich um eine sehr seltene Erkrankung (Bernard 1995;

Bertram et al. 2009). Grundsätzlich können folgende Formen der EBA unterschieden werden: Bei der klassischen mechano-bullösen Form kommt es bereits durch leichte Traumata zu akral betonten straffen Blasen unterschiedlicher Größe. Die Läsionen heilen meist nur unter Narbenbildung aus und können danach sowohl hyper- als auch hypopigmentiert sein. Neben dem Hautbefall ist auch die Entstehung einer Nageldystrophie einer Ösophagusstenose möglich. Die bzw. generalisierte inflammatorische Form kann dem bullösen Pemphigoid sehr stark ähneln und klinisch nicht immer von diesem unterschieden werden (Roenigk 1971; Schmidt und Zillikens 2013). EBA kann aber auch andere Autoimmundermatosen imitieren (Gupta et al. 2012). Das Autoantigen COL7 ist Hauptbestandteil von Ankerfibrillen der dermoepidermalen Junktionszone (DEJ) (vgl. Abbildung 2). Es ist ein Homotrimer, das aus drei identischen Kollagen-Typ-VII-Alpha-1-Proteinen besteht. Jedes dieser Proteine besteht aus zwei Nichtkollagen-Domänen sowie einer mittigen Kollagendomäne (vgl. Abbildung 3, S. 26) (Wegener et al. 2014). Bei nahezu allen Patienten sind die Autoantikörper (AAK) gegen Epitope der N-terminalen Nichtkollagendomäne (NC1) gerichtet (Gammon et al. 1993; Lapiere et al. 1993). Werden die AK in einen anderen Organismus übertragen, führen sie auch hier zu einer Aktivierung von Leukozyten und somit zu einer subepidermalen Blasenbildung. Dies ist sowohl für die transplazentare Übertragung bei Neugeborenen (Abrams et al. 2011) als auch für Hautproben gesunder Probanden beschrieben. In Kombination mit der Beobachtung, dass der Serumspiegel mit Krankheitsaktivität korreliert (Kim et al. 2013), liegt nahe, dass die AK selbst pathogen sind (Sitaru et al. 2002a; Recke et al. 2014).



Abbildung 2: Autoantigene Zellverbindungen der der Haut Desmosomen verbinden Epithelzellen untereinander, Hemidesmosomen verbinden Epithelzellen mit der Basallamina. Typ VII Kollagen ist als Hauptbestandteil von Ankerfibrillen für die Verbindung des Epithels mit darunterliegenden dem Stroma unerlässlich (Bruckner-Tuderman et al. 1989; Bieber et al. 2010). (Abbildung mod. nach Bieber et al. 2010, Figure 2)

2.3.2.2 EBA-Modelle

Um die pathologischen Abläufe bei der Entstehung der EBA zu untersuchen, wurden verschiedene Modelle entwickelt. Grob können diese in Ex-vivo- und In-vivo-Modelle unterteilt werden. Als Ex-vivo-Modelle können beispielsweise sog. Kryoschnitt-Assays (Sitaru et al. 2002a; Shimanovich et al. 2004) und Haut-Zellkulturen (Gammon et al. 1984) verwendet werden. Zwar kann an diesen z. B. die Interaktion der Leukozyten mit dem Fc-Teil der AAK gut untersucht werden, jedoch spiegeln diese vereinfachten Modelle die komplexen Prozesse in vivo nur begrenzt wider. So sind über die Mechanismen, die bei der Infiltration von Leukozyten in die Haut eine Rolle spielen, sowie über den Zeitverlauf der Entzündung nur geringe Aussagen möglich (Sitaru 2007). In-vivo-Modelle eignen sich zur detaillierteren Untersuchung. Hier sind besonders zwei Maus-Modelle relevant: Bei den beschriebenen passiven AK-Transfer-EBA-Maus-Modellen wird entweder Human-anti-Human-COL7-IgG (Woodley et al. 2006) oder Kaninchen-anti-Maus-COL7-IgG (Sitaru et al. 2005) subkutan injiziert. Bei dem aktiven EBA-Modell hingegen wird rekombinantes COL7 mit einem Adjuvans subkutan injiziert. Daraufhin bildet die Maus AK gegen körpereigenes COL7 (Sitaru et al. 2006). In beiden Fällen kommt es im Anschluss zu einer Spaltbildung in der DEJ. Da das aktive Modell zusätzlich die Immunreaktion gegen das COL7 imitiert, spiegelt es zwar die Vorgänge in Patienten besser wider, jedoch ist es besonders bei der Verwendung von KO-Mäusen sehr aufwendig. Dies hängt damit zusammen, dass die Krankheitsaktivität stark vom genetischen Hintergrund abhängig ist. So eignen sich vor allem SJL-Mäuse für das aktive Modell. KO-Mäuse sind jedoch meist nicht als SJL-Mäuse verfügbar und müssen erst aufwendig gekreuzt werden (Sitaru 2007).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das passive AK-Transfer-EBA-Modell, wie von Sitaru und Kollegen beschrieben, verwendet. Dieses Modell ermöglicht die Untersuchung der Effektorphase der EBA im Zeitverlauf unter kontrollierten Bedingungen (Sitaru et al. 2005):

2.3.2.3 Versuchsablauf des passiven EBA-Modells

Drei Mal im Abstand von jeweils zwei Tagen wurde 50 µg des affinitätschromatographisch gereinigten Kaninchen-anti-Maus-COL7c-IgGs subkutan injiziert. Die subkutane Gabe erfolgte an Tag 0 in den Nacken, an Tag 2 in das rechte Vorderbein und an Tag 4 in das linke Hinterbein der knochenmarkstransplantierten Mäuse. Nach etwa 2 – 4 Tagen bilden sich bei vielen Inzucht-Stämmen, darunter auch C57BI/6-Mäusen, subdermale Blasen, die dem Krankheitsbild im Menschen sowohl in klinischer als auch histopathologischer Betrachtung ähneln (Sitaru 2007). Während eines dreiwöchigen Beobachtungszeitraums erfolgte die Beurteilung der Krankheitsausprägung zu fünf Zeitpunkten. Die Beurteilung wurde unter einer größenadaptierten intraperitonealen Narkose mit $150 - 200 \,\mu$ I Ketamin/Xylazin durchgeführt. Im Folgenden sind die Herstellung von affinitätschromatographisch gereinigtem Kaninchen-anti-Maus-COL7c, die Generierung von Knochenmarkschimären sowie die im Laufe des Experiments erfolgten Untersuchungen genauer beschrieben.

2.3.2.4 Generierung von Kaninchen-anti-Maus-COL7c-IgG

Das Kaninchen-anti-Maus-COL7c-IgG (im Folgenden anti-mCOL7c-IgG) reagiert in der Haut von Mäusen mit der NC1-Domäne des murinen Kollagen VII und induziert dort experimentelles EBA. Die meisten Epitope der autoreaktiven Antikörper von Patienten mit EBA sind gegen die gleiche Domäne des humanen Orthologs gerichtet (Gammon et al. 1993; Lapiere et al. 1993). Die Herstellung des anti-mCOL7c-IgGs erfolgte, wie zuvor von Bieber und Kollegen beschrieben, in drei Schritten (Bieber et al. 2016): Zunächst erfolgte die Immunisierung von Kaninchen mit rekombinanten Peptiden der NC1-Domäne des Kollagen VII, woraufhin die Kaninchen die entsprechenden Antikörper bildeten. Aus dem Serum dieser Kaninchen wurde zunächst das Gesamt-IgG und im Anschluss das antimCOL7c-IgG affinitätschromatografisch isoliert. Von mir wurde die Isolierung des IgGs mit bereits zuvor von Mitarbeitern unseres Labors hergestellten AffinitätschromatographieSäulen durchgeführt. Zum Verständnis sind jedoch alle erforderlichen Schritte im Folgenden kurz erläutert.

2.3.2.4.1 Immunisierung von Kaninchen

Die erforderlichen Peptide wurden, wie in Abbildung 3 kurz beschrieben, isoliert und zur Immunisierung an die Eurogentec GmbH geschickt. Dort wurden die Peptide äquimolar in Freund-Adjuvans gelöst und die Kaninchen mit 250 µg subkutan immunisiert. Die Beimpfung der Kaninchen erfolgte drei Mal in einem Abstand von 15 Tagen. Im Anschluss wurde den Kaninchen in regelmäßigen Abständen Serum abgenommen. Dies wurde bei -20 °C bis zur Isolierung des IgGs gelagert.



Abbildung 3: Aufbau Kollagen VII Kollagen VII besteht aus drei identischen Kollagen Typ VII Alpha 1 Proteinen. Jedes dieser Proteine besteht aus einer Nicht-Kollagen-Domäne am NH-2 Terminus (NC1), einer mittigen Kollagen Domäne und Nicht-Kollagen-Domäne einer am COOH-Terminus (NC2). Drei Kollagendomänen bilden dabei – wie auch bei anderen Kollagenen – eine Trippelhelix. Die NC1-Domäne vermittelt die Adhäsion an Strukturproteine. Zwei End zu End verbundene

Kollagen-VII-Moleküle bilden ein Dimer, das durch Disulfidbrückenbindungen am NH2-Terminus stabilisiert wird. Die cDNS dreier Peptide (A,B,C) der murinen NC1-Domäne wurden in einen linearen pGEX-6P-1 Vektor kloniert und durch E.Coli BL21 exprimiert und danach aufgereinigt. Die Nummern unter den Fragmenten bezeichnen die Aminosäuren, die die Peptide begrenzen (Sitaru et al. 2005). (Abbildung mod. nach Sitaru et al. 2005, Figure 1)

2.3.2.4.2 Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von Kaninchen-IgG

Die Affinitätschromatographie ist eine wichtige Methode in der Biochemie, die es durch die hochspezifische Interaktion zweier Moleküle ermöglicht, Proteine oder andere Moleküle aufzureinigen. Diese Interaktionen können zum Beispiel zwischen Antikörper und Antigen oder Ligand und Zielprotein bestehen. Dabei wird ein dem zu isolierenden Molekül komplementäres Molekül fest an die Matrix der Chromatographie-Säule gebunden. Werden nun Moleküle auf die Matrix gegeben, binden die zu isolierenden Moleküle vorübergehend. Diese Bindung kann in einem zweiten Schritt durch z. B. Änderung des pH-
Wertes oder Zugabe eines Antagonisten rückgängig gemacht werden. Zur Isolierung von IgG eignet sich das in Zellwänden des Streptokokkenstamms G148 vorkommende Protein G. Protein G bindet den Fc-Teil von IgG und schützt die Bakterien so vor der Immunreaktion des Körpers. Die reversible Bindung von IgG an Protein G ermöglicht aber auch dessen Verwendung zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von IgG (Björck und Kronvall 1984).

Die Isolierung des Gesamt-IgG erfolgte nach der von Sitaru und Kollegen beschriebenen Methode (Sitaru et al. 2002b): 100 ml Kaninchen-Immunserum wurden auf 5 ml Protein G Resin gegeben und eine Stunde bei 4 °C auf einem Röhrchenroller inkubiert. Das Serum wurde verworfen und die Säule mit 1x PBS gespült, bis die photometrisch (280 nm) gemessene Protein-Konzentration bei < 0,05 mg/ml lag. Anschließend wurden das IgG mit 0,1 M Glycin-Puffer pH 2,8 (4 °C) eluiert und mit Tris-Puffer pH 9 (RT) neutralisiert, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern. Nachdem eine Protein-Konzentration von < 0,1 mg/ml gemessen wurde, wurde die Säule mit 1M NaCl-Puffer sowie mit 1x PBS gewaschen und anschließend in 20 % Ethanol bei 4 °C gelagert. Das eluierte Gesamt-IgG wurde, angelehnt an die Beschreibung von Howe und Kollegen, in einer Dialysemembran mit Polyethylenglycol 20.000 konzentriert und anschließend über Nacht bei 4 °C gegen 1x PBS dialysiert (Howe et al. 1964).

2.3.2.4.3 Aufreinigung von Kaninchen-anti-Maus-COL7c-IgG

Für die Aufreinigung von anti-mCOL7c-IgG wurden Affinitätschromatographie-Säulen, an deren Matrix Kollagen VII durch einen Polyhistidin-Tag (His-Tag) gebunden wurde, verwendet. Der His-Tag ist eine kurze Aminosäuresequenz aus mehreren Histidin-Molekülen, die durch rekombinante Klonierung an Peptide oder Proteine gekoppelt und z. B. durch Bakterien exprimiert werden kann. Proteine mit His-Tag lassen sich durch Chelatbildung an Metall-Affinitätschromatographie-Säulen mit z. B. mit Nickel- oder Kobalt-Ionen aufreinigen (Hengen 1995). Aufgereinigte His-Tag Proteine können daraufhin fest an z. B. spezielle Gele, die für Affinitätschromatographie verwendet werden können, gebunden werden.

Die His-Tag-mCOL7c-Peptide wurden von Mitarbeitern unseres Labors angelehnt an die Beschreibung von Sesarman und Kollegen isoliert und aufgereinigt (Sesarman et al. 2008).

Daraufhin erfolgte die Immobilisierung an Affi-Gel 10 wie von Bieber und Kollegen beschrieben (Bieber et al. 2016).

Das isolierte Gesamt-IgG wurde auf die fertige Affinitätschromatographie-Säule gegeben und bei 4 °C 20 Minuten auf einem Röhrchenroller inkubiert. Der Inhalt der Säule wurde in einem Gefäß gesammelt und die Säule anschließend mit 1x PBS sowie mit Triton-Puffer (850 mM NaCl und 1 % Triton in 1x PBS) gewaschen. Die Waschung der Säule wurde mit 1x PBS wiederholt, bis die photometrisch gemessene Proteinkonzentration (280nm) bei < 0,01 mg/ml lag. Das anti-mCOL7c-IgG wurde anschließend mit 0,1 M Glycin-Puffer pH 2,8 eluiert, bis ebenfalls eine Proteinkonzentration von < 0,01 mg/ml gemessen wurde. Folgend wurde der pH-Wert des Eluats mit 1 M Tris-Puffer pH 9 auf 7,2 angehoben. Die Säule wurde mit 20 mM Tris-Puffer pH 7,2 sowie durch einen Zyklus 20 mM Tris + 0,5 M NaCl pH 7,2 regeneriert. Nach einer Waschung mit 1x PBS wurden die oben genannten Isolierungsschritte zweifach wiederholt und die Säule anschließend bis zur nächsten Verwendung in 20 % Ethanol bei 4 °C gelagert. Das Eluat wurde in einer Dialysemembran mit Polyethylenglycol 20.000 konzentriert und anschließend über Nacht bei 4 °C gegen 1x PBS dialysiert. Eine weitere Konzentrierung sowie Filtersterilisierung des aufgereinigten anti-mCOL7c-IgGs erfolgte in 50 ml 30K Zentrifugationsfiltern durch mehrfache Zentrifugation mit einer Eppendorf 5810R-Zentrifuge bei 4000 Umdrehungen pro Minute und 4 °C für zehn Minuten. Die Konzentration wurde mit einem NanoDrop 2000c Spektralphotometer gemessen und die Reaktivität durch indirekte Immunfluoreszenz an der Haut eines Mauseschwanzes überprüft (siehe 2.3.2.8.2, S. 33).

2.3.2.5 Knochenmarkstransplantationschimären

Bereits 1901 war die schädliche Wirkung von Röntgen- und Gammastrahlen bekannt und ein möglicher Einsatz in der Therapie von Tumoren wurde diskutiert (Rollins 1904). Heute beinhalten diverse Therapieschemata zur Behandlung von Tumoren die Bestrahlung mit Röntgen- bzw. Gammastrahlen (Delaney et al. 2005). Auch die sich schnell teilenden Zellen des KMs werden durch diese Strahlen geschädigt. Dies wird sich beispielsweise bei der Ganzköperbestrahlung zur Vorbereitung auf eine Knochenmarkstransplantation zunutze gemacht (Wong et al. 2018). In der Immunologie ergeben sich hieraus vielfältige Möglichkeiten. Werden Mäuse mit 10 Gray (Gy) bestrahlt, so sterben 100 % dieser Mäuse aufgrund der kompletten Zerstörung hämatopoetischer Zellen binnen 30 Tagen. Erhalten

die Mäuse jedoch anschließend gesundes KM intravenös, regeneriert sich das KM in den meisten Fällen (McCulloch und Till 1960). Aufgrund des identischen genetischen Hintergrunds von Inzucht-Mäusen ist keine Abstoßungsreaktion zu befürchten. Unter anderem ist es möglich, Knochenmark, das sich in einem Gen von den Zellen des Empfängers unterscheidet, zu injizieren. Hierdurch entstehen chimäre Mäuse, deren Knochenmark sich genetisch von den restlichen Zellen des Körpers unterscheidet. Wurde zuvor beispielsweise in einem Krankheitsmodell ein Unterschied in der Krankheitsausprägung zwischen Mäusen mit und ohne verändertem Gen festgestellt, kann so untersucht werden, ob hämatopoetische oder nicht-hämatopoetische Zellen für diesen Unterschied verantwortlich sind (Holl 2013). Um den Erfolg der Transplantation zu untersuchen, können kongene Mäuse verwendet werden, die ein verändertes CD45-Allel (CD45.1 statt CD45.2) aufweisen. Da sich dieses Protein auf der Oberfläche aller kernhaltigen hämatopoetischen Zellen befindet, ist es durch die simultane Anfärbung beider CD45-Moleküle mithilfe der FC möglich, den prozentualen Anteil der transplantierten Zellen an den Leukozyten des Bluts zu ermitteln (Sadik et al. 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Knochenmarkschimären generiert. Dies ermöglicht nicht nur die Überprüfung der Funktionalität der Alox15^{-/-} PMN in vivo per se, sondern zusätzlich eine Untersuchung der Funktionalität der Alox15^{-/-} PMN im Umfeld radioresistenter WT Zellen und vice versa.

2.3.2.5.1 Generierung von Knochenmarkstransplantationschimären

Knochenmarkschimären wurden, wie zuvor von Sadik und Kollegen beschrieben und in Abbildung 4 kurz dargestellt, generiert (Sadik et al. 2012):



Abbildung 4: Generierung von Knochenmarkchimären Sechs Wochen alte Wildtyp C57BL/6, CD45.1 (im Folgenden WT) und *Alox15^{-/-}* C57BL/6, CD45.2⁺ (im Folgenden Alox15^{-/-}) Mäuse wurden mit 10 Gy γ -Strahlung bestrahlt. Am gleichen Tag wurde wie beschrieben das KM von Mäusen gleichen Genotyps und Geschlechts isoliert, aufgereinigt und es wurden die Zellen gezählt (vgl. 2.3.1.2, S. 15). Die Konzentration wurde auf 100 x 10⁶ Zellen / ml in PBS angepasst und 100 μ l (10 x 10⁶ Zellen) in den Kombinationen WT \rightarrow WT, $Alox15^{-/-} \rightarrow Alox15^{-/-}$ Alox15^{-/-} \rightarrow WT, WT \rightarrow Alox15^{-/-} und (Genotyp KΜ Spender \rightarrow Genotyp Empfänger) mit einer 26 G Kanüle in die Schwanzvene der Empfängermäuse injiziert. Die Kombinationen WT \rightarrow WT und Alox15^{-/-} \rightarrow Alox15^{-/-} wurden als Kontrolle generiert, um für mögliche Effekte der Bestrahlung zu kontrollieren. (Eigene Abbildung in Zusammenarbeit mit Rosemarie Castera, angelehnt an Steiner et al. 2006, Figure 1)

2.3.2.5.2 Ly6G CD45.1/ CD45.2 Färbung zur FC-Analyse

Der Erfolg der Knochenmarkstransplantation wurde sechs Wochen später durch die simultane Anfärbung von CD45.1, CD45.2 und Ly6G überprüft. Das Vorgehen entsprach mit leichten Modifikationen dem von Sadik und Kollegen (Sadik et al. 2012): Es wurden 15 µl Blut aus der Mandibularvene mit 15 µl 50 mM EDTA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vermischt, um die Koagulation des Blutes zu verhindern. Die Erythrozyten wurden daraufhin durch Zugabe von 1 ml Lysepuffer lysiert und die restlichen Zellen anschließend zweifach mit 500 μ l MACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 400 G, 4 °C, 4 Minuten). Die unspezifische Bindung von Antikörpern wurde durch die fünfminütige Inkubation bei 4 °C mit 5 µl FcR-Block reduziert. Anschließend wurden mit dem APC-Maus-anti-Maus-CD45.1-AK (1:100) und dem FITC-Maus-anti-Maus-CD45.2-AK (1:75) die beiden verschieden CD45-Moleküle sowie mit dem Ratte-anti-Maus-Ly6G-PE-AK (1:200) die Granulozyten durch eine 30-minütige Inkubation bei 4 °C angefärbt. Nach einer zweifachen Waschung mit 500 μ l MACS-Puffer (Zentrifugation: 400 G, 4 °C, 4 Minuten) wurden die Proben mit einem MacsQuant analysiert. Mit Hilfe von FlowJow wurden die Daten folgendermaßen ausgewertet: Dubletten wurden ausgeschlossen und ein Gate um die Granulozyten Population gelegt. Von diesen Zellen wurden die Ly6G⁺ Zellen ermittelt und diese als CD45.1 gegenüber CD45.2 dargestellt. Hieraus wurde der prozentuale Anteil transplantierter Zellen ermittelt. Lag dieser Anteil bei > 95 %, wurde die Transplantation als erfolgreich gewertet.

2.3.2.6 Beurteilung der Krankheitsausprägung des Antikörper-Transfer-EBA-Modells

Das Antikörper-Transfer-EBA-Modell kann sich durch die Bildung von Erythemen, Blasen, Erosionen, Krusten und Alopezie äußern (Sitaru et al. 2005). Zur Beurteilung der Krankheitsausprägung wurde in Anlehnung an Sezin an jedem der fünf Untersuchungstage die von oben genannten Symptomen betroffene Körperoberfläche bestimmt (Sezin 2016). Die Krankheitsausprägung wurde an Tag 6, 10, 14, 18 und 21 beurteilt. Dabei wurde die in Tabelle 2 dargestellte prozentuale Aufteilung der Körperoberfläche zugrunde gelegt. Der betroffene Anteil der Körperoberfläche wurde im Zeitverlauf dargestellt. Bei der Untersuchung war dem Untersucher nicht bekannt, welcher Gruppe die untersuchte Maus zugeordnet war, um Bias zu verhindern.

Da in Abhängigkeit vom Käfig und vom Geschlecht der Tiere ein Batch-Effekt festgestellt wurde, wurde dieser, wie von Gordon und de Graaf beschrieben, korrigiert (Smyth und Graaf 2015).

Körperteil	Anteil an Körperoberfläche [%]			
Ohr (links)	2,5			
Ohr (rechts	2,5			
Auge (links)	0,5			
Auge (rechts)	0,5			
Schnauze	2,5			
Mundschleimhaut	2,5			
Kopf und Nacken	9			
Vorderbein (links)	5			
Vorderbein (rechts	5			
Hinterbein (links)	10			
Hinterbein (rechts)	10			
Schwanz	10			
Rumpf	40			
Gesamt	100			

Tabelle 2: Prozentualer Anteil einzelner Körperregionen an gesamter Körperoberfläche

2.3.2.7 Präparierung peripherer Blut-Zellen zur FC-Analyse

Um den Einfluss der 12/15-Lipoxygenase auf die Zusammensetzung der Leukozyten des peripheren Bluts im Zeitverlauf einer Entzündungsreaktion zu untersuchen, wurde die relative und absolute Anzahl der Neutrophilen, Monozyten, B- sowie T-Zellen an Tag 0, 6, 10, 14, 18 und 22 des Experiments bestimmt. Dies wurde, angelehnt an das No-lyse whole blood analysis Protokoll von Miltenyi Biotech, wie folgt durchgeführt (Miltenyi Biotech): An jedem Untersuchungstag wurden 15 μ l Blut aus der Mandibularvene jeder Maus mit 15 μ l 50 mM EDTA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vermischt, um die Koagulation des Blutes zu verhindern. Die unspezifische Bindung von Antikörpern wurde durch die fünfminütige Inkubation bei 4 °C mit 5 μ l FcR-Block reduziert. Anschließend erfolgte die zehnminütige Inkubation bei 4 °C mit 5 μ l der folgenden Antikörper: Mit dem anti-Maus-CD45-Vioblue-AK, dem anti-Maus-Ly6G-PerCP-AK, dem anti-Maus-Ly6C-PE-AK, dem anti-Maus-CD3-PEVio-AK und dem anti-Maus-CD19-APCVio-AK wurden in der entsprechenden Reihenfolge alle Leukozyten, PMN, Monozyten, T- und B-Zellen angefärbt. Nach der Inkubation erfolgte die zweifache Waschung mit 500 μ l MACS-Puffer (Zentrifugation: 400 G, 4 °C und 4 Minuten) und die Resuspendierung zu einem finalen Volumen von 600 μ l in MACS-Puffer. Dies entspricht einer 40-fachen Verdünnung des ursprünglichen Blut-Volumens. Am MacsQuant wurde ein Trigger für den V1-Kanal, der zwischen VioBlue, CD45-positiven und -negativen Zellen unterscheidet, verwendet. Dadurch wurden nur CD45⁺-Zellen, also Leukozyten, in die Analyse eingeschlossen. Mit dem MacsQuant wurden die relativen und absoluten Zellzahlen der verschiedenen Leukozyten sowie die absoluten Zellzahlen der gesamten Leukozyten bestimmt. Die absoluten Werte wurden durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 40 errechnet.

2.3.2.8 Histopathologie

2.3.2.8.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Der klinische Phänotyp der EBA in den Mäusen wurde durch eine Histopathologie mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) bestätigt. Für die Histopathologie wurde ein Standardprotokoll des Instituts für Dermatologie verwendet: Hautbiopsien läsionaler Haut wurden direkt *post mortem* entnommen und in 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Proben in Paraffin eingebettet, mit einem Mikrotom in 6 µm dicke Schnitte geschnitten und folgend mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. HE-Schnitte wurden für jede Maus an Tag 22 des Experiments angefertigt.

2.3.2.8.2 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)

Um die Reaktivität des anti-Maus-mCOL7c-IgGs zu testen, wurde vor der Induktion des EBA Models eine IIF durchgeführt: Es wurden 6 µm dicke Hautschnitte aus gesunder muriner Schwanzhaut 10 Minuten in eiskaltem Aceton inkubiert und anschließend drei Mal mit 1x PBS gewaschen. Um die Schnitte wurden mit einem hydrophobem Dako-Stift Kreise gezogen. Anschließend wurden die Proben in einer Serienverdünnung (1:1000 bis 1:256.000) von anti-mCOL7c-AK in 1x PBS eine Stunde bei RT inkubiert. Nachdem die Proben drei Mal in 1x PBS gewaschen wurden, wurden sie mit einem Sekundärantikörper (Esel-anti-Kaninchen-IgG-Alexa-Fluor-594-AK) in einer Verdünnung von 1:500 eine Stunde inkubiert. Unter einem Keyence Mikroskop wurde die Bindung des anti-mCOL7c-IgGs an die DEJ überprüft.

2.3.2.9 Statistik

Die die Krankheitsausprägung und die Leukozytenmigration betreffenden Daten wurden mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse ausgewertet. Fehlten Daten zufällig, z. B., wenn eine Blutentnahme bei einer Maus nicht möglich war, wurde stattdessen die RestrictedMaximum-Likelihood-Methode angewendet. Anschließend schloss sich eine Korrektur der Alphafehler-Kumulierung mit Hilfe des Tukey Post-hoc Tests an. Werte wurden bei einem p-Wert ≤ 0,05 als statistisch signifikant gewertet. Alle Daten wurden mit GraphPad Prism ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 *Alox15* Defizienz führt zu einer überaktiven PMN Subpopulation, die Abweichungen des Zellkerns aufweist

Basierend auf früheren Daten unserer Arbeitsgruppe, die beschreiben, dass PMN von *Alox15^{-/-}* Mäusen reaktiver als die von WT Mäusen sind und sich in zwei Subpopulationen unterteilen, war unsere Hypothese, dass die SSC^{high} Subpopulation für die gesteigerte Reaktivität der PMN verantwortlich ist. Um dies zu prüfen, wurde eine Reihe an Versuchen durchgeführt, die die Intensität, mit der PMN ihre antimikrobielle Funktion ausüben, untersuchen.

3.1.1 Alox15^{-/-} SSC^{high} PMN zeigen einen gesteigerten Oxidative Burst

Um die ROS-Freisetzung zu untersuchen, wurden PMN von WT und *Alox15^{-/-}* Mäusen isoliert, mit einem FACS sortiert und im Anschluss mit PMA oder Immunkomplexen stimuliert (vgl. 2.3.1.5, S. 17).

Wie auch bei den folgenden Versuchen isolierten wir mit dem Neutrophilen Isolierungskit von Miltenyi aus dem KM zwischen 5 x 10⁶ und 10 x 10⁶ Zellen pro Maus. Ein geringer Anteil der PMN wurde mit den PMN Markern Ly6G und CD11b sowie mit DAPI angefärbt. In der Durchflusszytometrie konnte so die Reinheit sowie der Anteil lebender Zellen überprüft werden. Hier zeigte sich, dass es sich bei über 95 % der isolierten Zellen um vitale PMN handelte.

Die restlichen Zellen wurden lediglich mit Ly6G angefärbt und anschließend im FACS sortiert: Ly6G⁺ Zellen wurden nach ihrem Signal im SSC in SSC^{high} bzw. SSC^{low} PMN sortiert. Je nach Isolierung erhielten wir 0,5 - 1,5 x 10⁶ $Alox15^{-/-}$ SSC^{high} PMN, 1 - 2,5 x 10⁶ $Alox15^{-/-}$ SSC^{low} PMN und 1,5 – 3,5 x 10⁶ WT SSC^{low} PMN. Ein geringer Teil dieser Zellen wurde mit Trypanblau angefärbt und unter dem Mikroskop auf Vitalität überprüft. Es zeigte sich, dass über 95 % der Zellen vital waren.

Ein beispielhafter Verlauf der Chemilumineszenz über die Zeit ist in Abbildung 5 dargestellt. Unter Stimulation zeigte sich unabhängig von der Art der Stimulation und des verwendeten chemilumineszierenden Reagenzes, wie in Abbildung 6 dargestellt, eine signifikant erhöhte normalisierte AUC der Chemilumineszenz (nAUC) in *Alox15^{-/-}* SSC^{high} PMN gegenüber WT PMN. Ohne Stimulation zeigte sich eine signifikant höhere nAUC von *Alox15^{-/-}* SSC^{high} PMN

gegenüber WT PMN in der Luminol Reaktion sowie eine signifikant höhere nAUC von *Alox15^{-/-}* SSC^{high} PMN gegenüber *Alox15^{-/-}* SSC^{low} PMN in der Lucigenin Reaktion. *Alox15^{-/-}* SSC^{low} PMN zeigten gegenüber WT PMN keine signifikant erhöhte nAUC. Die Mittelwerte, Standardabweichung (SD), Standardfehler (SEM) und p-Werte sind im Anhang unter 7.2.2 in Tabelle 5 auf S. 89 f. aufgeführt.



Abbildung 5: ROS-Freisetzung im Zeitverlauf Dargestellt ist die ROS-Freisetzung im Zeitverlauf über eine Stunde unter Stimulierung mit IK. Die Angabe der Lichtintensität erfolgte in relativen Lichteinheiten (RLU, von engl. *Relative Light Unit*). 25.000 Zellen pro Näpfchen und zwei Näpfchen pro Gruppe. Beispielhafte Darstellung einer Wiederholung (n = 1). (Die Kurven sind als Mittelwert ± SEM dargestellt)



Abbildung 6: normalisierte ROS-Freisetzung (a-f) zeigen die normalisierte AUC der Chemilumineszenz-Reaktion über einen Zeitraum von zwei Stunden unter entsprechender Stimulierung. Je Wiederholung erfolgte eine Untersuchung von 25.000 Zellen pro Näpfchen und zwei Näpfchen pro Gruppe. Bei jeder unabhängigen Wiederholung wurde die AUC der WT Probe ohne Stimulation als 0, die WT Probe mit Stimulation als 1 normalisiert (vgl. 2.3.1.5, S. 17). (a,c,e) zeigen die normalisierte Chemilumineszenz von Luminol als Indikator der intra- und extrazelluläre ROS-Freisetzung, (b,d,f) die normalisierte Chemilumineszenz von Lucigenin als Indikator der extrazelluläre ROS-Freisetzung (Die Graphen sind als Mittelwert ± SEM dargestellt; $n \ge 3$; * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$) 37

3.1.2 Alox15^{-/-} SSC^{high} PMN bilden mehr NETs

Der Nachweis von NETs erfolgte wie beschrieben (vgl. 2.3.1.6, S. 18). Analog zur ROS-Freisetzung waren die *Alox15^{-/-}* SSC^{high} PMN reaktiver und bildeten prozentual mehr NETs (vgl. Abbildung 7). Diese signifikant erhöhte Bereitschaft NETs zu bilden, ließ sich jedoch nur unter nicht stimulierten Bedingungen nachweisen. So stieg zwar die Anzahl NET bildender Zellen nach Stimulation, jedoch war der Unterschied zwischen den *Alox15^{-/-}* SSC^{high} PMN und den WT PMN nicht mehr signifikant. In Abbildung 8 sind mikroskopische Bilder NET bildender PMN dargestellt.



Abbildung 7: NETose Auswertung Dargestellt ist der Anteil NET bildender PMN ohne Stimulation aus vier unabhängigen Versuchen. (Die Graphen sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt; n = 4; *p \leq 0,05; WT PMN Mittelwert: 0,2598 % \pm 0,0452 %; *Alox15^{-/-}* SSC^{low} PMN Mittelwert: 0,3301 % \pm 0,0819 %; *Alox15^{-/-}* SSC^{high} PMN Mittelwert: 2,515 % \pm 1,144 %; p-Wert WT vs. *Alox15^{-/-}* SSC^{high} = 0,0182)



Abbildung 8: mikroskopische Bilder NETose Die Bilder (a-c) zeigen NET bildende PMN ohne Stimulation (a) WT PMN; (b) *Alox15^{-/-}* SSC^{low} PMN; (c) *Alox15^{-/-}* SSC^{high} PMN; Die Bilder wurden mit einer 600 x Vergrößerung aufgenommen. Die Zellen wurden mit DAPI (blau), anti-H3-AK (grün) sowie mit anti-MPO-AK (rot) gefärbt.

3.1.3 Alox15^{-/-} SSC^{high} PMN haben eine gesteigerte Phagozytoseaktivität

Neben der ROS-Freisetzung und der NET-Bildung wurde die Phagozytoseaktivität bestimmt (vgl. 2.3.1.8, S. 20). Auch hier zeigte sich, dass die $Alox15^{-/-}$ SSC^{high} PMN reaktiver sind, also vermehrt Partikel phagozytierten. Wurden PMN mit PMA stimuliert, so zeigte sich, wie in Abbildung 9 dargestellt, sowohl für $Alox15^{-/-}$ SSC^{high} gegenüber $Alox15^{-/-}$ SSC^{low}, als auch für $Alox15^{-/-}$ SSC^{high} gegenüber WT PMN eine signifikant erhöhte normalisierte Phagozytoserate (p-Wert in beiden Fällen = 0,0499). Unter nicht stimulierten Bedingungen konnte jedoch nach vier unabhängigen Versuchen keine signifikant erhöhte Phagozytoserate festgestellt werden (p-Wert $Alox15^{-/-}$ SSC^{high} vs. WT = 0,0844: p-Wert $Alox15^{-/-}$ SSC^{high} vs. $Alox15^{-/-}$ SSC^{low} = 0,1378).



Abbildung 9: normalisierte Phagozytoserate in SSC^{high} PMN erhöht Abgebildet ist normalisierte die Phagozytoserate nach einer dreistündigen Inkubationszeit mit und ohne Stimulation durch 100 nM PMA. Bei jeder unabhängigen Wiederholung wurde die WT Probe ohne Stimulation als 0, die WT Probe mit Stimulation durch PMA als 1 normalisiert (vgl. 2.3.1.8, S. 20). (Die Graphen sind als Mittelwert ± SEM dargestellt; n = 4; *p \leq 0,05; Alox15^{-/-} SSC^{low} Mittelwert: 0,1231 ± 0,2692, Alox15^{-/-} SSC^{low} + PMA Mittelwert: 1,058 ± 0,093, Alox15^{-/-} SSC^{high} Mittelwert: 0,7002 ± 0,3477, *Alox15^{-/-}* SSC^{high} + PMA Mittelwert: $1,929 \pm 0,2034$)

3.1.4 Alox15^{-/-} SSC^{high} PMN sind hypersegmentiert

Um die morphologischen Eigenschaften der PMN beurteilen zu können, wurden in Kollaboration mit Herrn Prof. Dr. König aus dem Institut für Anatomie, transmissionselektronenmikroskopische Bilder angefertigt (vgl. 2.3.1.7, S. 19). Hier zeigte sich, dass die *Alox15^{-/-}* SSC^{high} PMN gegenüber den *Alox15^{-/-}* SSC^{low} bzw. WT PMN deutlich stärker segmentiert sind. Drei beispielhafte Aufnahmen sind in Abbildung 10 dargestellt.





Abbildung10:Alox15-/-SSC^{high}PMNsindteilweisehypersegmentiert

(a-c) zeigen transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen mit einer 6000 x Vergrößerung. (a) WT PMN, (b) Alox15^{-/-} SSC^{low} PMN, (c) Alox15^{-/-} SSC^{high} PMN. Die Pfeile zeigen beispielshaft auf einen wenig segmentierten neutrophilen Granulozyten in der Alox15^{-/-} SSC^{low} Subpopulation bzw. auf einen Kern mit sieben Segmenten SSC^{high} der Alox15^{-/-} in Subpopulation.



3.1.5 *Alox15^{-/-}* SSC^{high} PMN haben einen gestörten Zellzyklus

Durch die veränderte Morphologie des Zellkerns und hier nicht angeführte Daten einer Ribonukleinsäure Sequenzierung gab es Indizien, dass der Zellzyklus in *Alox15^{-/-}* PMN verändert ist. Daher wurde der Zellzyklus wie beschrieben analysiert (vgl. 2.3.1.9, S. 21). Zunächst wurde als Kontrolle, wie in Abbildung 11 gezeigt, der Zellzyklus von Jurkat Zellen

3. Ergebnisse

untersucht. Hier ergab sich bei jeder unabhängigen Wiederholung des Versuchs, dass sich die Jurkat Zellen zu etwa 55 % in der G1- bzw. G0-Phase, zu etwa 25 % in der S-Phase und zu etwa 20 % in der G2- bzw. M-Phase befanden und somit im zu erwartenden Bereich lagen (Miyoshi et al. 2004). Bei der anschließenden Untersuchung der PMN zeigte sich, dass sich PMN der *Alox15^{-/-}* SSC^{high} Subpopulation signifikant häufiger in der G2 bzw. M-Phase befanden als die PMN der WT Population (p = 0,0219) (vgl. Abbildung 12). Auch *Alox15^{-/-}* SSC^{low} PMN befanden sich häufiger als WT PMN in der G2 Phase. Dieser Zusammenhang ist jedoch für *Alox15^{-/-}* SSC^{low} PMN nicht signifikant (WT Zellen in G2-Phase: Mittelwert: 2,86, SD: 1,2; SSC^{low} Zellen in G2-Phase: Mittelwert: 18,63, SD: 5,86 p-Wert: 0,53).



Abbildung 11: Zellzyklusanalyse Jurkat Zellen Links: Gatingstrategie: Zunächst wurden Einzelzellen und im Anschluss die Lymphozytenpopulation in die Analyse eingeschlossen. Rechts: Im Histogramm wird die Anzahl der Zellen je Intensitätseinheit im VioBlue-Kanal dargestellt. Da es sich um eine lineare Darstellung handelt, ist der DNS-Gehalt der Zellen direkt proportional zur Intensität. Zellen, die durch die zweite Spitze repräsentiert werden, enthalten den doppelte DNS-Gehalt (4 c \rightarrow G2- bzw. M-Phase) gegenüber den Zellen der ersten Spitze (2 c \rightarrow G1- bzw. G0-Phase). Die dazwischenliegenden Zellen replizieren ihre DNS und befinden sich somit in der S-Phase des Zellzyklus.



Abbildung 12: Zellzyklusanalyse zeigt einen Großteil der Alox15^{-/-} SSC^{high} PMN in G2-Phase Angegeben ist die prozentuale Verteilung der Zellen der WT, $Alox15^{-/-}$ SSC^{low} und $Alox15^{-/-}$ SSC^{high} Population auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus. (Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen. *p-Wert ≤ 0,05)

3.2 Alox15^{-/-} PMN sind in vivo in der Lage, ihre Effektorfunktion auszuüben

Um zu überprüfen, ob die *Alox15^{-/-}* PMN trotz der oben beschriebenen Veränderungen der Funktion und des Zellkerns in der Lage sind, ihre Effektorfunktion auszuüben, wurde ihre Funktion *in vivo* analysiert. Hierzu eignet sich das passive EBA-Modell, da für die Entstehung des Gewebeschadens eine Rekrutierung und Aktvierung von PMN in der Haut von Mäusen notwendig ist (Chiriac et al. 2007; Ludwig 2013). Durch die Verwendung eines chimären Modells kann zudem der Effekt radioresistenter Zellen auf die Funktion der PMN beurteilt werden.

Im Folgenden wird zunächst der Erfolg der verwendeten Methoden überprüft. Anschließend erfolgt die Beschreibung der Krankheitsaktivität sowie des Differenzialblutbildes im Zeitverlauf.

3.2.1 Reaktivität des isolierten Kaninchen-anti-mCOL7c-IgGs

Für die Initiierung des passiven EBA Models wurde Kaninchen-anti-Maus-COL7c-IgG aufgereinigt (vgl 2.3.2.4, S. 25 ff.). Nach Konzentrierung des Proteins ergab sich eine Konzentration über 0,5 mg/ml. Um zu überprüfen, ob und wie stark das IgG an das murine Kollagen bindet, wurde eine Serienverdünnung des IgGs angefertigt und die Bindung des IgGs in einer indirekten Immunfluoreszenz überprüft (vgl. 2.3.2.8.2, S. 33). Hier zeigte sich, dass das IgG entlang der DEJ bis mindestens zu einer Verdünnung von 1:64.000 band.

3.2.2 Nachweis der erfolgreichen Knochenmarkstransplantation mittels Durchflusszytometrie

Durch die unterschiedlichen CD45-Moleküle der WT und der *Alox15^{-/-}* Mäuse kann der Erfolg der Knochenmarkstransplantation untersucht werden (vgl. 2.3.2.2.2, S. 31). Die Transplantation wurde als erfolgreich gewertet, wenn über 95 % der untersuchten PMN das gewünschte CD45-Molekül exprimierten. Beispielhaft sind unter Abbildung 13 Diagramme mit zwei erfolgreichen Transplantationen beigefügt.



Abbildung 13: Transplantationserfolg Oben: Gatingstrategie: Zunächst wurden Einzelzellen, dann die Granulozytenpopulation im FSC x SSC und anschließend Ly6G⁺-Zellen in die Analyse eingeschlossen. Unten: Gleichzeitige Darstellung des FITC- und APC-Signals. FITC – CD45.2 gibt die Herkunft der PMN aus *Alox15^{-/-}* Mäusen, APC – CD45.1 die Herkunft der PMN aus WT Mäusen an. Links unten ist eine erfolgreich transplantierte WT Maus, die *Alox15^{-/-}* KM erhielt, rechts unten ist eine erfolgreich transplantierte *Alox15^{-/-}* Maus, die WT KM erhielt.

3.2.3 Kaninchen-anti-mCOL7c-IgG führt *in vivo* zu einer dermoepidermalen Spaltbildung

Nachdem die Reaktivität des anti-mCOL7c-IgGs bereits vor den Experimenten *in vitro* überprüft worden war, wurde am letzten Tag des Experiments läsionale Haut der Mäuse entnommen und mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt (vgl. 2.3.2.8.1, S. 33). Hier konnte gezeigt werden, dass die AAK auch *in vivo* zu einer Spaltbildung in der DEJ führen. Beispielhaft ist in Abbildung 14 eine mikroskopische Aufnahme muriner Haut mit einer solchen subepidermalen Blase dargestellt.



Abbildung 14: beispielhafte Darstellung der Spaltbildung in der dermoepidermalen Junktionszone HE-Färbung in 200 x Vergrößerung, Haut einer WT → WT Maus an Tag 22 des Experiments. Pfeil zeigt auf Spaltbildung in DEJ.

3.2.4 *Alox15^{-/-}* PMN sind *in vivo* in der Lage, eine Gewebeschädigung herbeizuführen

Nachdem der Erfolg der Transplantation überprüft worden war, wurde experimentelle AK-Transfer-EBA an den Tagen 0, 2 und 4 des Experiments induziert (vgl. 2.3.2.3, S. 25). Anschließend erfolgte die Beurteilung der Krankheitsausprägung an den Tagen 6, 10, 14, 18 und 21 des Experiments (vgl. 2.3.2.6, S. 31). Hier zeigte sich, wie in Abbildung 15 zu erkennen, dass die Krankheitsausprägung in $Alox15^{-/-} \rightarrow Alox15^{-/-}$ und WT \rightarrow WT Mäusen während der ersten Phase des Experiments nahezu identisch ist. Eine etwas stärkere Krankheitsausprägung der $Alox15^{-/-} \rightarrow Alox15^{-/-}$ Mäuse an Tag 6 und 10 war nicht signifikant. Demzufolge sind $Alox15^{-/-}$ PMN trotz Veränderungen ihres Zellkerns und ihrer Funktion in der Lage, eine Gewebeschädigung herbeizuführen.

Auffällig war jedoch, dass WT \rightarrow WT Mäuse gegenüber $Alox15^{-/-} \rightarrow Alox15^{-/-}$ Mäusen eine reduzierte Krankheitsausprägung in der zweiten Hälfe des Experiments aufwiesen. Diese reduzierte Krankheitsausprägung ist an den Tagen 14 und 18 des Experiments statistisch

signifikant (vgl. Tabelle 3). Die Krankheitsausprägung der Gruppen WT \rightarrow Alox15^{-/-} und Alox15^{-/-} \rightarrow WT liegen zwischen der der beiden erstgenannten.

	Gruppe	n	Mittelwert	SD	SEM	p-Wert
14	$WT \rightarrow WT$	13	3,24	0,893	0,248	
Tag	$Alox15^{-/-} \rightarrow Alox15^{-/-}$	15	4,80	1,400	0,362	0,0008
18	$WT \rightarrow WT$	13	2,67	0 <i>,</i> 885	0,246	
Tag	$Alox15^{-/-} \rightarrow Alox15^{-/-}$	15	3,73	1,408	0,364	0,0365
21	$WT \rightarrow WT$	13	2,67	0 <i>,</i> 885	0,246	
Tag	$Alox15^{-/-} \rightarrow Alox15^{-/-}$	15	3,01	1,294	0,334	0,1508

Tabelle 3: Statistik der Krankheitsausprägung an Tag 14, 18 und 21



Abbildung 15: stärkere Krankheitsausprägung in $Alox15^{-/-} \rightarrow Alox15^{-/-}$ Mäusen in zweiter Hälfte des Experiments Legende: Spender-KM \rightarrow KM-depletierte-Empfänger-Maus; Krankheitsausprägung der AK-Transfer-EBA in WT \rightarrow WT vs. $Alox15^{-/-} \rightarrow Alox15^{-/-}$ vs. WT \rightarrow $Alox15^{-/-}$ vs. $Alox15^{-/-} \rightarrow$ WT Mäusen. Dargestellt sind Daten aus zwei unabhängigen Versuchen. Die angegebenen Prozentwerte sind um den Batch-Effekt korrigiert. Graph als Mittelwert \pm SEM; Daten wurden mit zweifaktorieller Varianzanalyse ausgewertet n = 13-17 Mäuse pro Gruppe; p-Werte geben Signifikanz zwischen WT \rightarrow WT vs. $Alox15^{-/-} \rightarrow$ $Alox15^{-/-}$ an; *p \leq 0,005; ***p \leq 0,0001

3.2.5 Mäuse mit Alox15^{-/-} KM zeigen ein gestörtes Differentialblutbild

Um den Einfluss radioresistenter und radiosensibler Zellen im *Alox15^{-/-}* Modell auf die Zeitkinetik der Leukozytenmigration in experimentellem EBA zu untersuchen, wurde den Mäusen an Tag 0, 6, 10, 14, 18 und 22 des Experiments Blut entnommen (vgl. 2.3.2.7, S. 32). In diesem wurde nun mit der Durchflusszytometrie der relative Anteil der PMN, Monozyten, B- und T-Zellen an allen Leukozyten bestimmt. Während der letzten unabhängigen Wiederholung des Experiments wurden zusätzlich die absoluten Werte der genannten Leukozyten gemessen. Die Leukozytenmigration im Zeitverlauf des experimentellen EBA ist in Abbildung 16 dargestellt.

Es zeigte sich, dass die gesamten Leukozyten in den Mäusen, die $Alox15^{-/-}$ KM erhielten, deutlich reduziert waren (p-Wert für den gesamten Zeitraum für WT \rightarrow WT vs. $Alox15^{-/-} \rightarrow Alox15^{-/-}$ bzw. $Alox15^{-/-} \rightarrow$ WT \leq 0,001; eine detaillierte Auflistung der statistischen Signifikanz ist im Anhang in Tabelle 6 auf S. 91 f. zu finden). Diese Reduktion ist vor allem auf eine Depletion der B-Zellen zurückzuführen. So sind die B-Zellen im Mittel um den Faktor 20-30 reduziert.

Aber auch die Anzahl von PMN ist im peripheren Blut von Mäusen, die *Alox15^{-/-}* KM erhielten, reduziert. Zwar ist diese Neutropenie bereits vor Beginn des Experiments statistisch signifikant, jedoch steigt die Neutrophilen-Zahl in Mäusen, die WT KM erhielten, nach Induktion der Entzündung deutlich an. Dieser Anstieg fällt in *Alox15^{-/-}* KM Mäusen bei absoluter Betrachtung deutlich geringer aus.

Ähnlich den PMN stieg auch die Monozytenzahl nach Induktion der AK-Transfer-EBA. Hier konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Lediglich bei Betrachtung der relativen Werte gab es Unterschiede. Diese ergaben sich aus der gleichbleibenden Monozytenzahl bei gleichzeitiger Reduktion der gesamten Leukozyten der Mäuse mit *Alox15^{-/-}* KM.

Bei den T-Zellen wurde ebenfalls eine Reduktion in Mäusen mit $Alox15^{-/-}$ KM gegenüber Mäusen mit WT KM festgestellt. Diese Reduktion ist jedoch bei $Alox15^{-/-} \rightarrow$ WT Mäusen weniger stark ausgeprägt als bei $Alox15^{-/-} \rightarrow Alox15^{-/-}$ Mäusen.



Abbildung 16: Differentialblutbild im Verlauf der AK-Transfer-EBA in Alox15^{-/-} Mäusen gestört Erfassung der Leukozytenzahl im Verlauf der EBA nach Bestrahlung mit einer tödlichen Dosis y-Strahlung und Rekonstitution der **KM-Funktion** durch Transplantation von WT bzw. Alox15^{-/-} KM; (a) Gesamtheit aller exprimierenden CD45 Zellen; (b) Legende: Spender-KM \rightarrow KMdepletierte-Empfänger-Maus; (c,e,g,i) absolute Zellzahl der jeweiligen Zellpopulation; (d,f,h,k) Anteil der jeweiligen Zellpopulation an Gesamtheit der Leukozyten; (c,d) CD45⁺, Ly6G⁺⁺, Ly6C⁺ Zellen; (e,f) CD45⁺, Ly6C⁺, Ly6G⁻, CD3⁻ Zellen; (g,h) CD45⁺, CD3⁺ Zellen; (i,k) CD45⁺, CD19⁺ Zellen; n pro Gruppe für absolute Werte: 4-9; n pro Gruppe für relative Werte: 10-22; Graph als Mittelwert + SEM; Signifikanzniveau bezieht sich auf

WT \rightarrow WT vs. Alox15^{-/-} \rightarrow Alox15^{-/-}; *p \leq 0,05; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001, ****p \leq 0,0001; Daten wurden statistisch mit zweifaktorieller Varianzanalyse ausgewertet und die p-Werte mit dem Tukey-Test angepasst.

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung der beiden *Alox15^{-/-}* PMN Subpopulationen

Die 12/15-LOX ist ein Enzym, das gewebe- bzw. kontextabhängig vielfältige Funktionen ausübt, die zum Teil sogar gegensätzlich sind. Unter anderem scheint es an der Regulation der Hämatopoese, von Entzündungsreaktionen und autoimmunen Prozessen beteiligt zu sein (Singh und Rao 2019). Bei all diesen Prozessen spielen neutrophile Granulozyten als erste Zellen einer Immunantwort eine wesentliche Rolle (Kolaczkowska und Kubes 2013). Während bisher auf zellulärer Ebene vor allem der Einfluss einer 12/15-LOX-Gendefizienz auf Makrophagen untersucht wurde, wurde mit dieser Arbeit erstmalig eine Charakterisierung der Funktion des *Alox15*-Gens in PMN durchgeführt.

4.1.1 Alox15^{-/-} SSC^{high} PMN zeigen eine gesteigerte Effektorfunktion

Wie bereits in den unveröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe dargestellt, wurde eine SSC^{high} PMN Subpopulation in 12/15-LOX-defizienten Mäusen festgestellt. In verschiedenen Versuchen, die nach Aufreinigung der beiden Subpopulationen mittels FACS durchgeführt wurden, zeigten sich deutliche Unterschiede zu WT PMN: *Alox15^{-/-}* SSC^{high}, nicht jedoch *Alox15^{-/-}* SSC^{low} PMN zeigten eine deutlich gesteigerte Aktivität. Bei gleicher Stimulation bildeten die *Alox15^{-/-}* SSC^{high} PMN mehr ROS, NETs und phagozytierten mehr Partikel als WT oder *Alox15^{-/-}* SSC^{low} PMN. Die Hypothese unserer Arbeitsgruppe, dass die *Alox15^{-/-}* SSC^{high} PMN für die gesteigerte Aktivität der Neutrophilen verantwortlich sind, konnte demzufolge bestätigt werden.

Die Auswertung des NETose Assays zeigte eine Besonderheit: Neutrophile Granulozyten bilden nach Stimulation durch PMA, aber auch durch Stimulation mit anderen Stoffen wie beispielsweise Interleukin-8, Bakterien und Antigen-Antikörper-Komplexen, NETs (Yang et al. 2016). In unserem NETose Assay bildeten die *Alox15^{-/-}* SSC^{high} PMN jedoch bereits ohne Stimulation vermehrt NETs. So ist eine Aktivierung im Verlauf des mehrstündigen Isolierungsprozesses, währenddessen die Zellen u. a. eine Sortierung im FACS durchlaufen, denkbar. Hiergegen spricht jedoch, dass die WT PMN, die als Kontrolle den gleichen Prozess durchliefen, nicht ebenfalls zur NET-Bildung neigten. Die 12/15-LOX Defizienz scheint demzufolge die PMN zur Bildung von NETs zu prädisponieren. Eine solche Prädisposition, also eine NET Bildung ohne Stimulation, ist u. a. bei Mäusen und Menschen mit Diabetes mellitus (Dm) beschrieben. Als Ursache vermuteten Carestia und Kollegen eine basale Erhöhung inflammatorischer Zytokine bei Patienten mit Dm-Typ-2 (Wong et al. 2015; Carestia et al. 2016).

Möglicherweise führt das Fehlen der 12/15-LOX zu einer ähnlichen Situation. Zahlreiche Produkte der 12/15-LOX sind antiinflammatorische Botenstoffe wie beispielsweise SPM (vgl. Tabelle 4, Seite 87). Resolvine und Protectine etwa führen zu einer Reduktion der Produktion proinflammatorischer Zytokine (Bannenberg et al. 2005; Hsiao et al. 2013). So ist eine Verschiebung des Gleichgewichts hin zu einem Überwiegen inflammatorischer Zytokine denkbar. Hierfür spricht, dass sich auch im ROS-Freisetzungs-Assay ohne Stimulation mit PMA eine Erhöhung der intra- und extrazellulären ROS-Produktion von *Alox15^{-/-}* SSC^{high} zeigte, während WT PMN ohne Stimulation kaum reaktive Sauerstoffspezies produzierten.

Auch die unter Stimulation ungehemmte ROS-Produktion und die hohe Phagozytoserate der *Alox15^{-/-}* SSC^{high} PMN gegenüber den WT PMN sprechen für ein Überwiegen antientzündlicher Metabolite durch die 12/15-LOX in PMN. Als verantwortlicher Metabolit kommt insbesondere Protectin DX in Frage, für das bereits nachgewiesen wurde, dass es die ROS-Produktion hemmt (Liu et al. 2014). Indes bleibt es unklar, woher diese Metabolite stammen. So kann in humanen neutrophilen Granulozyten die mRNA der 15-LOX-1 zwar induziert werden (Levy et al. 2001), in frisch isolierten PMN wird *Alox15* jedoch nicht exprimiert (Archambault et al. 2018). Ob es sich um einen zellautonomen Effekt handelt, könnte jedoch mithilfe eines PMN-spezifischen, konditionellen Knockout-Modells analysiert werden.

Möglicherweise ist die SSC^{high} Subpopulation die Folge dieser gesteigerten Aktivität. Die Aktivierung von PMN geht neben einer gesteigerten ROS-Produktion mit der Bildung von Organellen einher, die Vakuolen ähnlich sind. Diese Steigerung der Komplexität der inneren Strukturen der Zelle könnte Ursache des erhöhten SSC-Signals sein (Kono et al. 2018).

4.1.2 **12/15-LOX-Defizienz führt zur Enthemmung der Proliferation und verändert die** Morphologie des Zellkerns

Besonders auffällig sind zudem die Ergebnisse der Zell-Zyklus-Analyse: Während sich PMN normalerweise nicht teilen und dauerhaft in der GO-Phase des Zellzyklus verbleiben (Boll und Fuchs 1970; Klausen et al. 2004), war der DNS-Gehalt in über 90 % der SSC^{high} PMN verdoppelt. Somit befanden sich ein Großteil der SSC^{high} PMN in der G2- bzw. M-Phase.

4. Diskussion

Auch die SSC^{low} PMN befanden sich mit etwa 19 % häufig in der G2- bzw. M-Phase. Hier wurde jedoch keine statistische Signifikanz gegenüber den WT-Zellen festgestellt.

Veränderungen des Zell-Zyklus wurden bereits in *Alox15^{-/-}* myeloischen Zellen der Milz von Middleton und Kollegen beschrieben: Befanden sich in WT Mäusen nur 2-3 % der Myeloidzellen in der S-, G2- oder M-Phase, so waren es in *Alox15^{-/-}* Mäusen 30-40 %. Auch die Apoptoserate war in diesen Zellen verringert. Dies wurde im Zusammenhang mit der Entstehung einer myeloproliferativen Erkrankung 12/15-LOX-defizienter Mäuse beschrieben, die sich in allen Mäusen spätestens im Alter von acht Wochen manifestierte. Pathogenetisch wurde das Fehlen der Inhibition des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Weges (PI3K) durch die 12/15-LOX bzw. deren Produkte vermutet (Middleton et al. 2006): PI3K reguliert die Aktivität der Proteinkinase B (PKB). Diese ist wiederum über zahlreiche Mechanismen an der Onkogenese durch z.B. Steigerung der Proliferationsrate und Hemmung der Apoptose beteiligt (Franke et al. 2003; Hers et al. 2011; Vogt et al. 2011). In anderen Geweben sind sowohl aktivierende als auch inhibierende Funktionen von 12/15-LOX Produkten auf die PKB beschrieben. Somit scheint die Regulierung des PI3K-Weges durch die 12/15-LOX gewebeabhängig zu sein. Auch der Transkriptionsfaktor Interferon-Konsensussequenzbindendes Protein (interferon consensus sequence binding protein = ICSBP) war in myeloischen Zellen dieser Mäuse verstärkt phosphoryliert und im Zellkern weniger stark angereichert, was eine verstärkte Expression des Onkogens Bcl-2 bedingte. PI3K-Inhibitoren führten zu einer Normalisierung der ICSBP-Funktion, der Bcl-2 Level und des Zellüberlebens. Middleton und Kollegen vermuteten demzufolge, dass die 12/15-LOX über die Inhibition der PI3K in myeloischen Zellen proliferationshemmend wirkt (Middleton et al. 2006). Unsere Daten stützen die von Middleton und Kollegen aufgestellte Hypothese, dass die 12/15-LOX auf myeloische Zellen proliferationshemmend wirkt.

Mit dem DNS-Gehalt in den SSC^{high} PMN korreliert die Segmentierung der Zellen, die in der TEM untersucht wurde. Waren Zellen der SSC^{low} Subpopulation wenig oder nicht segmentiert, zeigten SSC^{high} PMN bis zu acht Segmente und waren somit hypersegmentiert. Ein Zusammenhang zwischen DNS-Gehalt und Segmentierung ist bisher nicht bekannt bzw. wurde in Bezug auf Aneuploidie bzw. Polyploidie nicht festgestellt (Schmalzl et al. 1970).

Da unreife PMN stabförmig und reife PMN segmentiert sind, ist es naheliegend, einen Zusammenhang zwischen dem Alter und der Segmentierung von PMN anzunehmen. So ist

4. Diskussion

es denkbar, dass es sich bei den hypersegmentierten PMN um gealterte PMN handelt, die ihre Fähigkeit, die Apoptose einzuleiten, verloren haben. PMN mit dieser Segmentierungsstörung werden dementsprechend auch als überreif bezeichnet (Tzankov et al. 2012). Hierfür spräche, dass Middleton und Kollegen in *Alox15^{-/-}* myeloischen Zellen eine Reduktion der Apoptoserate bzw. ein verlängertes Überleben nachwiesen (Middleton et al. 2006). Der Nachweis dieses Zusammenhangs ist aber aufgrund der schwierigen technischen Durchführbarkeit der Beobachtung von PMN in vivo schwer zu erbringen. So beschränkten sich Versuche mit dieser Fragestellung auf einen Beobachtungszeitraum von einer Stunde (Sanchez und Wangh 1999). Eine Hypersegmentierung ist hingegen im Zusammenhang mit einem Folsäure-, Vitamin B₁₂- oder Eisenmangel (Bills und Spatz 1977; Thompson et al. 1989; Westerman et al. 1999) bzw. bei Tumorerkrankungen beschrieben. Hypersegmentierung konnte von Bailey und Kollegen durch Inkubation mit dem Serum tumortragender Mäuse induziert werden (Bailey et al. 1989). Im Zusammenhang mit Tumoren werden hypersegmentierten PMN tumorsupprimierende Eigenschaften zugeschrieben, die mit einer erhöhten ROS-Bildung und erhöhten proinflammatorischen Zytokinen assoziiert sind (Fridlender et al. 2009). Die Hypersegmentierung dieser PMN konnte durch ACE-Hemmer und Retinsäure induziert und durch mTor-Inhibitoren verhindert werden. Wie auch in unseren Versuchen bildeten diese hypersegmentierten PMN vermehrt NETs (Shrestha et al. 2016; Shrestha et al. 2017).

Durch unsere Arbeit konnte ein hemmender Effekt der 12/15-LOX auf die Segmentierung von PMN gezeigt werden. Als möglicher Mechanismus kommt eine Inhibition von mTOR durch die 12/15-LOX in Frage.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die 12/15-LOX einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation und die Segmentierung von PMN hat. So wird bei 12/15-LOX Defizienz eine PMN Subpopulation gebildet, die sich neben der oben beschriebenen gesteigerten Aktivität durch eine vermehrte Segmentierung und einen enthemmten Zellzyklus auszeichnet. Diese deutlichen Veränderungen der PMN sind überraschend, da nicht stimulierte PMN *Alox15* zumindest im Menschen nicht exprimieren (Archambault et al. 2018).

4.2 Alox15^{-/-} PMN führen in vivo zur Gewebeschädigung

Die deutlichen Veränderungen der Morphologie des Zellkerns und der Funktion 12/15-LOX-defizienter PMN werfen die Frage auf, ob diese PMN auch *in vivo* in der Lage sind zielgerichtet Entzündungsreaktionen hervorzurufen. Schließlich zeichnen sich Entzündungsreaktionen *in vivo* durch komplexe Vorgänge aus. Um eine Entzündungsreaktion zu modellieren, in der insbesondere die Funktion der PMN untersucht werden kann, entschieden wir uns für das experimentelle Antikörper-Transfer-EBA-Modell.

Wie zuvor erläutert, wurde anti-mCOL7c-IgG in das subkutane Fettgewebe injiziert. Diese banden an das murine COL7. Sind die Antikörper nun an COL7 gebunden, findet eine Fcy-Rezeptor-abhängige Entzündungsreaktion statt: In der DEJ lagern sich die Komplementfaktoren C3 und C5b ab und es kommt zu einer Aktivierung des Komplementsystems. Das Komplementsystem ist für die Entstehung der Hautläsionen essenziell. So kommt es in Abwesenheit von C5 zu keiner (Sitaru et al. 2005) und in Abwesenheit des alternativen Wegs des Komplementsystems zu einer deutlich reduzierten Krankheitsaktivität (Mihai et al. 2007). Neben weiteren Zytokinen üben Spaltprodukte der Komplementfaktoren eine chemotaktische Wirkung auf PMN aus. Insbesondere ist aber die 5-LOX und ihr Produkt LTB4 für die Rekrutierung von PMN und die Entstehung von Hautläsionen unabdingbar (Sezin et al. 2017).

Die Rekrutierung von PMN sowie anderer Leukozyten verläuft im Allgemeinen in zwei Phasen: Die in der frühen vaskulären Phase dilatierenden Gefäße bedingen eine gesteigerte Durchblutung. Erwärmung und Rötung sind die Folge. Anschließend kommt es zur Erhöhung der Permeabilität der Gefäßwände und dem Verlust proteinreicher Flüssigkeit ins Gewebe. Aufgrund des erhöhten Gefäßdurchmessers und des Flüssigkeitsverlusts verringert sich die Flussgeschwindigkeit des Blutes (Kumar et al. 2015). Dies ist für die Extravasation von Leukozyten in der anschließenden zellulären Phase erforderlich (Marchesi 1961). Hierzu sind zahlreiche Adhäsionsmoleküle an den Endothelzellen und den Leukozyten notwendig, die zytokin-abhängig induziert werden. Zunächst verlangsamen sich die Zellen durch lose Zell-Zell-Kontakte und rollen am Endothel entlang. Eine feste Bindung und die Transmigration durch das Endothel schließen sich an. Im Gewebe folgen

die Leukozyten einem Konzentrationsgradienten an Chemokinen und gelangen so an den Ort der Entzündungsursache (Kumar et al. 2015).

Im Rahmen der EBA erfolgt die Aktivierung der PMN in Abhängigkeit der Bindung des Fcγ-Rezeptors IV an die Immunkomplexe (Kasperkiewicz et al. 2016). Zusammen mit anderen Rezeptoren führt dessen Aktivierung zu einer Stimulation verschiedener Kinasen u. a. der SRC-Familie (Kovács et al. 2014). Schlussendlich führt die Aktivierung der PMN über die Freisetzung der Matrix-Metalloproteinase sowie die Aktivierung der NADPH-Oxidase und konsekutiver ROS-Bildung zur dermoepidermalen Spaltbildung. So sind Mäuse, in denen neutrophile Granulozyten mittels anti-Gr-1-Antikörpern depletiert wurden, gegenüber der Entwicklung der EBA immun (Shimanovich et al. 2004; Chiriac et al. 2007).

Die 12/15-LOX scheint die obengenannten Mechanismen während der Effektorphase der EBA nicht wesentlich zu beeinflussen. So ist der Krankheitsverlauf während der ersten zehn Tage in allen vier Gruppen nahezu identisch. Dies legt nahe, dass die Transmigration und Aktivierung von 12/15-LOX-defizienten PMN *in vivo* nicht wesentlich gestört ist. Eine nahezu identische Krankheitsausprägung während der ersten zehn Tage ist insofern erstaunlich, als dass die Anzahl der PMN im peripheren Blut von $Alox15^{-/-} \rightarrow Alox15^{-/-}$ und $Alox15^{-/-} \rightarrow$ WT Mäusen deutlich reduziert ist. Auch der Anstieg der PMN im peripheren Blut, wie er in WT \rightarrow WT bzw. WT $\rightarrow Alox15^{-/-}$ Mäusen zu sehen ist, bleibt nach Exposition mit anti-mCOL7c-lgG aus.

4.3 12/15-LOX Defizienz führt zu einer verzögerten Auflösung der Entzündung

Interessant ist, dass Entzündungsreaktionen in der Haut im Rahmen des experimentellen EBA-Modells während der Resolutionsphase durch die 12/15-LOX beeinflusst werden. Hier scheinen die antiinflammatorischen/pro-resolutorischen Eigenschaften der 12/15-LOX die inflammatorischen zu überwiegen. So zeigte sich in der zweiten Hälfte des Experiments, nachdem die Krankheitsausprägung ihren Höhepunkt erreichte hatte, eine schnellere Regeneration in Mäusen, in denen die 12/15-LOX exprimiert wurde.

Unsere Daten legen nahe, dass die verzögerte Auflösung der Krankheitsaktivität auf eine verzögerte Inhibition der Transmigration bzw. Aktivierung neutrophiler Granulozyten zurückzuführen ist. Dies kann mit einer Reduktion der verfügbaren 12/15-LOX-abhängig produzierten SPM zusammenhängen. Wie einleitend beschrieben, üben SPM über diverse

4. Diskussion

Mechanismen ihre antiinflammatorische Funktion aus. Unter anderem hemmen sie die Migration von PMN ins Gewebe und vermitteln deren Efferozytose durch Mφ (Serhan et al. 2012; Serhan et al. 2015a). Ferner inhibieren SPM die NF-κB Aktivierung und COX-2 Expression (Marcheselli et al. 2003) und initiieren die Bindung von Chemokinen an apoptotische PMN sowie T-Zellen und beschleunigen so die Elimination von Chemokinen (Ariel et al. 2006). Außerdem beschleunigen sie die Regeneration von Gewebe und reduzieren Schmerz (Serhan et al. 2012). Eine besondere Bedeutung kommt möglicherweise dem Resolvin DX zu, das, wie zuvor bereits erwähnt, in der Lage ist, die Menge der durch PMN freigesetzten ROS zu reduzieren (Liu et al. 2014).

Unsere Daten lassen keine genaue Lokalisation der 12/15-LOX Expression zu, jedoch ist davon auszugehen, dass sowohl hämatologische, radiosensible Zellen als auch radioresistente Zellen Alox15 exprimieren und an der Synthese antientzündlicher und proresolutorischer Metabolite beteiligt sind. So waren sowohl Alox15^{-/-} \rightarrow WT als auch WT \rightarrow *Alox15^{-/-}* Mäuse Maße nicht im gleichen beeinträchtigt wie in $Alox15^{-/-} \rightarrow Alox15^{-/-}$ Mäuse. Die Beteiligung radioresistenter Zellen ist interessant, da sich ein Großteil der Forschung zu Alox15 auf hämatologische Zellen bezieht (Singh und Rao 2019). Die Expression von Alox15 wurde jedoch u. a. in Epithelzellen nachgewiesen (Sigal et al. 1992).

Zwar ist für die Entstehung der Krankheitsausprägung bei der EBA eine Abhängigkeit von neutrophilen Granulozyten bekannt, jedoch ist dies für die Auflösung der Entzündung nicht sicher der Fall. Nichtsdestotrotz ist eine Beteiligung der Neutrophilen an der beschleunigten Auflösung der Entzündung in Mäusen, die *Alox15* exprimieren, möglich. So führen proinflammatorische Zytokine wie Prostaglandin E₂ in Neutrophilen zu einer Induktion der *Alox15* Expression und somit zu einem Wechsel der synthetisierten Lipidmediatorklasse von pro- zu antientzündlich bzw. pro-resolutorisch. Demzufolge leitet der Beginn einer Entzündungsreaktion bereits ihr eigenes Ende ein (Levy et al. 2001). Daneben ist eine Beteiligung eosinophiler Granulozyten denkbar. Diese werden erst während der Resolutionsphase in das Gewebe rekrutiert und beschleunigen 12/15-LOX-abhängig über die Synthese von SPM die Auflösung der Entzündung (Yamada et al. 2011). Kürzlich konnten wir zeigen, dass während des passiven EBA-Maus-Modells ein

Großteil der eosinophilen Granulozyten *Alox15* exprimieren, was eine Funktion dieser Population in der Resolution der Entzündungsreaktion nahelegt (Sezin et al. 2020).

4.4 Alox15^{-/-} PMN als mögliche Modulatoren der EBA

Der aggravierte Krankheitsverlauf im passiven EBA Maus-Modell legt nahe, dass auch Menschen mit einer Mutation im *Alox15* Gen eine stärkere Krankheitsausprägung aufweisen. Da EBA jedoch eine sehr seltene Erkrankung ist, stellt sich vor allem die Frage, ob Mutationen im *Alox15* Gen den Ausbruch der EBA im Menschen triggern können. Wie einleitend erwähnt, sind verschiedene Mechanismen beschrieben, über die die Defizienz der 12/15-LOX zu einem Bruch der immunologischen Toleranz führt. Zum einen ist die 12/15-LOX an der nicht-entzündlichen Entfernung apoptotischer Zellen durch residente Makrophagen beteiligt. Ist diese durch das Fehlen der 12/15-LOX gestört, zeigen Mäuse ein Lupus-ähnliches Krankheitsbild (Uderhardt et al. 2012). Zum anderen zeigen dendritische Zellen, in denen die 12/15-LOX ausgeschaltet ist, sowohl im Menschen als auch in der Maus eine beschleunigte Reifung und eine Veränderung ihres Zytokin-Profils. Dies bedingt eine gesteigerte Th17-Differenzierung. Vermutlich erfolgt über diesen Mechanismus die Zunahme der Krankheitsaktivität in Th17-abhängigen Autoimmunerkrankungen in *Alox15-^{-/-}* Mäusen (Emerson und LeVine 2004; Rothe et al. 2015).

Auch bei EBA sind für die Produktion von Autoantikörpern durch B-Zellen T-Zellen notwendig (Sitaru et al. 2010). Hier scheinen CD4⁺ T-Zellen mit einer Th1-Polarisierung eine bedeutende Rolle zu spielen, deren Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen abhängig ist (Hammers et al. 2011; Iwata et al. 2013). Interessant ist, dass neutrophile Granulozyten vermutlich über die Beeinflussung des Zustroms antigenpräsentierender Zellen in die drainierenden Lymphknoten die Menge der produzierten Antikörper beeinflussen. So zeigten Mäuse, in denen Neutrophile depletiert wurden, eine geringere Antikörperproduktion (Samavedam et al. 2014). Es ist verlockend zu spekulieren, dass die diversen aktivierenden Effekte einer 12/15-LOX Defizienz auf PMN diesen Mechanismus beeinflussen. So wäre die Durchführung des aktiven EBA-Modells mit *Alox15^{-/-}* Mäusen interessant, um Informationen über die Induktionsphase der EBA zu erhalten.

4.5 Hämatologische Veränderungen durch die 12/15-LOX

Der Einfluss der 12/15-LOX auf hämatopoetische Zellen wird kontrovers diskutiert. Nach der Entwicklung der *Alox15^{-/-}* Mäuse in den 1990ern, wurden zunächst keine

Veränderungen des peripheren Blutbildes beobachtet. In der Arbeit von Sun und Kollegen wurden in *Alox15^{-/-}* Mäusen 5100 ± 1990 und in WT Mäusen 7860 ± 4360 Leukozyten je µl gemessen. Die Leukozyten waren in *Alox15^{-/-}* Mäusen also reduziert, der Unterschied zu WT Mäusen war jedoch nicht signifikant. Auch der relative Anteil der *Alox15^{-/-}* und WT Leukozyten war im Differenzialblutbild ähnlich. So betrug der Anteil an den gesamten Leukozyten für Lymphozyten etwa 80 %, für Granulozyten etwa 15 % und für Monozyten etwa 3 - 4 % (Sun und Funk 1996).

Die hier verwendeten Alox15^{-/-} Mäuse wurden ursprünglich auf einem 129S2-Hintergrund produziert, dann jedoch über elf Generationen mit C57BL/6 Mäusen gekreuzt, so dass sie zu 99,95 % genetisch mit C57BL/6 Mäusen identisch sind. So wie wir erwarb das Wistar Institut in Philadelphia diese Mäuse ebenfalls von Jackson Laboratory (Taylor et al. 2012). An diesem Institut wurde 2006 veröffentlicht, dass Alox15^{-/-} Mäuse häufig eine myeloproliferative Erkrankung entwickelten (Middleton et al. 2006). Vier Jahre später wurde am selben Institut eine wichtige Rolle der 12/15-LOX bei der Hämatopoese beschrieben: Es zeigte sich, dass Alox15^{-/-} Mäuse eine deutliche Reduktion der Lymphozyten, insbesondere der B-Zellen, aufwiesen. Auch eine Reduktion der Monozyten wurde beobachtet. Die Werte für PMN waren jedoch normwertig. Im Rahmen eines KM-Transplantationsexperiments zeigte sich zudem, dass ein zellautonomer Defekt der hämatopoetischen Stammzellen bestand (Kinder et al. 2010). Diese Ergebnisse konnten von Taylor und Kollegen im Jahr 2012 jedoch nicht reproduziert werden. Im Gegensatz zu unseren Mäusen und denen des Wistar Instituts wurden die Mäuse, die von Taylor und Kollegen verwendet wurden, jedoch nicht von Jackson Laboratory erworben. Sie stammen allerdings ebenfalls von den Mäusen ab, die von Funk und Kollegen generiert wurden, wurden jedoch über sieben Generationen mit C57BL/6 Mäusen gekreuzt. Hier zeigte sich nur ein geringer Unterschied zwischen den *Alox15^{-/-}* und WT Mäusen in der Leukozytenzahl oder einer Leukozytenpopulation. Auch nachdem die Mäuse vier weitere Male mit C57BL/6 Mäusen gekreuzt wurden, war kein deutlicher Unterschied festzustellen (Taylor et al. 2012).

Interessanterweise haben wir nun ähnliche Daten wie Kinder und Kollegen erhoben. Neben der zuvor beschriebenen Störung des Zellzyklus in PMN haben wir eine Reduktion der Leukozyten im peripheren Blutbild beobachtet, die vornehmlich auf eine reduzierte Anzahl

der B-Zellen zurückzuführen ist. Die im Wistar Institut beobachtete Reduktion der Monozyten konnten wir jedoch nicht beobachten. Hingegen waren bei uns die PMN signifikant reduziert. Wie bei Kinder und Kollegen wurde diese Reduktion zellautonom vermittelt. So war auch bei $Alox15^{-/-} \rightarrow WT$ Mäusen eine Reduktion der Leukozyten, insbesondere der B-Zellen und PMN, festzustellen. Dieser zellautonome Effekt trifft jedoch nur in reduziertem Maße auf die T-Zellen zu. Diese waren zwar sowohl in $Alox15^{-/-} \rightarrow Alox15^{-/-}$ Mäusen als auch in $Alox15^{-/-} \rightarrow WT$ Mäusen reduziert, jedoch war diese Reduktion in $Alox15^{-/-} \rightarrow WT$ Mäusen weniger stark ausgeprägt: Hatten WT \rightarrow WT Mäuse etwa 2000 T-Zellen pro µl, so waren es in $Alox15^{-/-} \rightarrow WT$ Mäusen etwa 1000 und in $Alox15^{-/-} \rightarrow Alox15^{-/-}$ Mäusen etwa 500.

Diese Daten unterstützen die Hypothese von Kinder und Kollegen, dass die hämatologische Stammzellfunktion von der Metabolisierung von Fettsäuren durch die 12/15-LOX-abhängig ist. Es ist bemerkenswert, dass die genetische Defizienz der 12/15-LOX u. a. eine Reduktion der B-Zellen um den Faktor 20-30 bedingt. Fraglich ist indes, warum die Arbeitsgruppe um Taylor die Unterschiede, die Kinder und Kollegen sowie auch wir sehen, nicht feststellen konnten.

Taylor und Kollegen schlugen als Ursache für die hämatologischen Veränderungen unbekannte Infektionen, lokale Umwelteinflüsse, epigenetische Veränderungen und spontane Mutationen der Wistar Population vor (Taylor et al. 2012). Sollten die hämatologischen Veränderungen nicht auf die 12/15-LOX Aktivität zurückzuführen sein, sind durch das zeitlich und örtlich unabhängige Auftreten des gleichen Phänotyps lokale Einflüsse jedoch unwahrscheinlich. Durch unsere Daten können auch auf das Wistar Institut begrenzte epigenetische und genetische Veränderungen ausgeschlossen werden. Denkbar sind hingegen bei Jackson Laboratory entstandene epigenetische Veränderungen oder Spontanmutationen.

Um dies zu überprüfen, kann beispielsweise der Phänotyp bei Wurfgeschwistern untersucht werden. Hier würden *Alox15^{-/-}* Mäuse mit WT Mäusen gekreuzt. Dies hat eine heterozygote F1-Generation zur Folge. Werden nun Mäuse der F1-Generation untereinander gekreuzt, entstehen in der F2-Generation in einem Verhältnis von 1:1:2 homozygote *Alox15^{-/-}*, homozygote WT und heterozygote Mäuse. Tritt der hämatologische Phänotyp nun unabhängig vom *Alox15*-Gen auf, beweist dies, dass andere Faktoren für

diesen Phänotyp verantwortlich sind (Kanagawa et al. 2000; Holmdahl und Malissen 2012; McCoy et al. 2017). Andererseits beweist ein Übereinstimmen des Phänotyps nicht das Fehlen von Störfaktoren. Hier kämen beispielsweise die Analyse des gesamten Genoms der *Alox15^{-/-}* Mäuse oder die Verwendung alternativer *Alox15^{-/-}*-Modelle in Betracht.

4.6 Alternative *Alox15^{-/-}* Modelle und Ausblick

Die Arbeit mit Knockout Mäusen gehört seit einigen Jahrzehnten zum Standardrepertoire eines an Genen forschenden Labors. Konventionelle KO-Mäuse haben jedoch den Nachteil, dass sie bei etwa 30 % aller Gene nicht eingesetzt werden können, da Mäuse ohne diese Gene nicht überlebensfähig sind. Homozygote Mäuse, bei denen beide Allele dieser Gene ausgeschaltet sind, sterben bereits während der Embryonalperiode oder postnatal (Wurst et al. 2011). Gu und Kollegen gelang es 1994 erstmals, ein konditionelles KO-Modell zu erstellen, bei dem eine DNS-Polymerase nur in T-Zellen ausgeschaltet war. Führte ein konventioneller KO zu einem letalem Phänotyp, so waren diese Mäuse überlebensfähig (Gu et al. 1994). In Kürze ist das Prinzip der Generierung einer konditionellen KO-Maus wie folgt beschrieben: Durch einen Vektor werden in zwei Introns Erkennungssequenzen, z. B. loxP, eingefügt, die von einer Rekombinase, z.B: Cre, erkannt werden können. Die Introns sind dabei so zu wählen, dass sie ein für die Expression des Proteins notwendiges, kritisches Exon flankieren. Bei Abwesenheit der Rekombinase werden die Erkennungssignale beim Spleißen entfernt und es entsteht ein funktionstüchtiges Protein. Ist jedoch eine Rekombinase vorhanden, wird die Sequenz zwischen den Erkennungssequenzen entfernt und es entsteht ein KO. Um nun ein gewebespezifisches KO zu erhalten, wird die Rekombinase an ein Gen gekoppelt, dessen Promoter nur in einem bestimmten Gewebe aktiviert wird (Wurst et al. 2011). Seit 2006 gibt es Bestrebungen, für jedes der etwa 20.000 proteinkodierenden Gene Mutationen in der embryonalen Stammzelle der C57BL/6 Linie zu etablieren (Collins et al. 2007). Häufig wird dazu ein tm1-Knockout-First-Allel verwendet, das, wie in Abbildung 17 erklärt, sowohl die Generierung einer konventionellen KO-Maus als auch einer konditionellen KO-Maus ermöglicht.



Abbildung 17: Knockout-first-Allel braune Kästen = Exons des Alox15-Gens, schwarze durchgezogene Linie = DNS-Strang mit Introns, gepunktete schwarze Linie = finales Genprodukt, farbliche Boxen = eingefügte Elemente. Die LacZ-Kassette besteht aus einem Spleißakzeptor (SA), einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES, von engl. internal ribosomal entry site) dem LacZ-Gen und einer Polyadenylierungssequenz (pA) (hier nicht dargestellt). Ist das tm1a-Allel eingefügt, wird das Gen mit allen Introns und Exons transkribiert. Das Spleißen der prä-mRNA führt jedoch dazu, dass am SA die Sequenz vorzeitig fortgesetzt und an der pA beendet wird. Es entsteht durch posttranskriptionelle Modifikation ein KO. Die IRES ermöglicht dennoch die Translation einer funktionstüchtigen β-Galactosidase und so den Nachweis der Expression des entsprechenden Gens. Wird das Allel nun durch die Cre-Rekombinase zu tm1b modifiziert, werden die Sequenzen zwischen der 1. und 3. loxP-Sequenz und somit die kritischen Exone entfernt und es entsteht ein wahrer KO auf DNS-Ebene. Weiterhin ist durch die β-Galactosidase ein Nachweis der Expression möglich. Wird das tm1a-Allel stattdessen mit einer Flippase (Flp) zu tm1c modifiziert, wird die Sequenz zwischen den beiden FRT-Sequenzen entfernt. Es ensteht ein konditionelles Allel, das die Translation eines funktionstüchtigen Proteins ermöglicht. Ein Nachweis der Expression über die β -Galactosidase ist nicht mehr möglich. Durch eine weitere Modifikation mit einer Cre-Rekombinase werden die kritischen Exone entfernt und es entsteht ein KO bzw. bei einer gewebespezifischen Cre-Rekombinase ein gewebespezifischer KO (MMRRC UC Davis; Skarnes et al. 2011). (Eigene Abbildung in Zusammenarbeit mit Rosemarie Castera, angelehnt an Skarnes et al. 2011, Figure 1)

Im Rahmen dieses Projekts bietet die weitere Verwendung des *Alox15^{tm1a(KOMP)Mbp_}* Mausmodells aufgrund der variablen Einsatzmöglichkeiten diverse Vorteile: Durch den Einsatz einer Cre-Deleter Maus, kann das *Alox15*-tm1a-Modell, das auf posttranskriptioneller Ebene ein Knockout darstellt, in ein tm1b bzw. wahren Knockout auf DNS-Ebene überführt werden. Die Überführung eines tm1a- in ein tm1b-Allel ist uns bereits gelungen.

Mit dem *Alox15*-tm1b-Modell können unsere Ergebnisse überprüft werden. Des Weiteren eignet sich das *Alox15*-tm1b-Modell durch die *LacZ*-Kassette zur Lokalisierung der *Alox15* Expression.

Aber nicht nur die Generierung des *Alox15*-tm1b-Modells ist für das weitere Projekt interessant. Durch die Kreuzung der *Alox15*^{tm1a(KOMP)Mbp} Maus mit einer FLP-Deleter-Maus kann ein tm1c-Modell erzeugt werden, das sich als konditionelles Knockout-Modell verwenden lässt. Über Mäuse, bei denen die Cre-Rekombinase z. B. an die Expression von MRP8 gekoppelt ist, lassen sich mit dem tm1c-Modell Mäuse entwickeln, deren *Alox15* Expression in PMN ausgeschaltet ist, die also lediglich in PMN *Alox15* tm1d-Allele besitzen (Skarnes et al. 2011; Abram et al. 2014). Mit diesem Modell ließe sich beispielsweise untersuchen, ob die gesteigerte Aktivität der *Alox15*^{-/-} PMN durch andere Zellen beeinflusst wird und ob *Alox15*^{-/-} PMN vorwiegend für die verzögerte Auflösung der Entzündung in PMN-abhängigen Entzündungsmodellen verantwortlich sind.

5. Zusammenfassung

Die 12/15-Lipoxygenase ist ein Enzym, das die Dioxygenierung von Lipiden am C12- und C15-Atom katalysiert. Sie ist an der Synthese einer Vielzahl an Metaboliten beteiligt und übt gewebe- beziehungsweise kontextabhängig vielfältige Funktionen aus. Unter anderem sind eine Beeinflussung der Hämatopoese, modulierende Effekte auf die Entstehung von autoimmunen Prozessen sowie pro- und antientzündliche Funktionen beschrieben.

Ein Großteil dieser Funktionen wird durch die Beeinflussung hämatologischer Zellen vermittelt. Inwieweit die 12/15-Lipoxygenase auch die Funktion von neutrophilen Granulozyten (PMN) als wichtige Effektorzellen in Entzündungen beeinflusst, ist bisher jedoch nur unzureichend beschrieben. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die genetische Defizienz der 12/15-Lipoxygenase eine Subpopulation neutrophiler Granulozyten mit einem hohen Signal im Seitwärtsstreulicht (SSC^{high}) in der Durchflusszytometrie bedingt. Außerdem zeigte sich in funktionellen Untersuchungen, dass die Effektorfunktion neutrophiler Granulozyten in 12/15-Lipoxygenase-defizienten (*Alox15^{-/-}*) Mäusen gesteigert ist.

Aufbauend auf den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe war das Ziel dieser Arbeit, die beiden Subpopulationen 12/15-Lipoxygenase-defizienter PMN nach morphologischen und funktionellen Gesichtspunkten zu charakterisieren. Außerdem sollte die Funktion von PMN in *Alox15^{-/-}* Mäusen anhand eines von PMN-abhängigen Entzündungsmodells untersucht werden.

Es zeigte sich, dass die PMN der SSC^{high} Subpopulation mehr *Neutrophil Extracellular Traps* bilden, größere Mengen reaktiver Sauerstoffspezies produzieren und mehr Partikel phagozytieren als Wildtyp PMN. Außerdem zeichnen sich diese SSC^{high} PMN durch eine Hypersegmentation sowie eine Störung des Zellzyklus aus. So befanden sich über 90 Prozent der SSC^{high} PMN in der G2-Phase.

Trotz dieser Veränderungen waren 12/15-Lipoxygenase-defiziente PMN weiterhin in der Lage *in vivo* eine Entzündungsreaktion hervorzurufen. So zeigte sich im Antikörper-Transfer-Epidermolysis-bullosa-acquisita-Modell während der ersten zehn Tage kein Unterschied in der Krankheitsaktivität zwischen *Alox15^{-/-}* und Wildtyp Mäusen. Lediglich während der Resolutionsphase zeigte sich eine verzögerte Auflösung der Entzündung in
Alox15^{-/-} Mäusen. Diese verzögerte Auflösung der Entzündung wurde sowohl durch radiosensible hämatologische Zellen als auch durch radioresistente Zellen vermittelt. Im Rahmen dieses Experiments wurde auch die Leukozytenmigration ins Blut beobachtet. Bei genetischer Defizienz der 12/15-LOX wurde eine deutliche Reduktion der Leukozyten im peripheren Blutbild beobachtet. Diese Leukopenie wurde vorwiegend durch eine massive Reduktion der B-Zellen verursacht. Jedoch war ebenfalls eine Reduktion der T-Zellen und PMN zu beobachten.

Insgesamt zeigte sich in dieser Studie, dass die 12/15-Lipoxygenase hemmend auf die Aktivität, die Segmentierung und die Proliferation von neutrophilen Granulozyten einwirkt. Die Effektorfunktion der PMN kann *in vivo* auch unabhängig von der 12/15-Lipoxygenase ausgeübt werden. Die Auflösung der Entzündung wird jedoch durch die 12/15-Lipoxygenase beschleunigt.

6. Literaturverzeichnis

- Abram CL, Roberge GL, Hu Y, Lowell CA (2014) Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice. Journal of Immunological Methods 408, 89–100
- Abrams ML, Smidt A, Benjamin L, Chen M, Woodley D, Mancini AJ (2011) Congenital epidermolysis bullosa acquisita: vertical transfer of maternal autoantibody from mother to infant. Archives of dermatology 147, 337–341
- Ackermann JA, Hofheinz K, Zaiss MM, Krönke G (2017) The double-edged role of 12/15lipoxygenase during inflammation and immunity. Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids 1862, 371–381
- Aitken RJ, Buckingham DW, West KM (1992) Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. Journal of cellular physiology 151, 466–477
- Archambault A-S, Turcotte C, Martin C, Provost V, Larose M-C, Laprise C, Chakir J, Bissonnette É, Laviolette M, Bossé Y, Flamand N (2018) Comparison of eight 15lipoxygenase (LO) inhibitors on the biosynthesis of 15-LO metabolites by human neutrophils and eosinophils. PloS one 13, e0202424
- Ariel A, Fredman G, Sun Y-P, Kantarci A, van Dyke TE, Luster AD, Serhan CN (2006) Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. Nature Immunology 7, 1209–1216
- Atkinson MA, Leiter EH (1999) The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? Nature medicine 5, 601–604
- Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. The Journal of Clinical Investigation 52, 741–744
- Bailey SC, Head JF, Greengard O (1989) Neutrophil maturation and hypersegmentation promoted in normal bone marrow by a carcinoma-elaborated protein factor. American journal of hematology 31, 159–165
- Bakke AC (2001) The principles of flow cytometry. Laboratory medicine 32, 207–211
- Bannenberg G, Serhan CN (2010) Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. Biochimica et biophysica acta 1801, 1260–1273
- Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH, Hong S, Serhan CN (2005) Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. Journal of immunology 174, 4345–4355
- Bernard P (1995) Incidence and Distribution of Subepidermal Autoimmune Bullous Skin Diseases in Three French Regions. Archives of dermatology 131, 48

- Bertram F, Bröcker E-B, Zillikens D, Schmidt E (2009) Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 7, 434–440
- Bieber K, Witte M, Sun S, Hundt JE, Kalies K, Dräger S, Kasprick A, Twelkmeyer T, Manz RA, König P, Köhl J, Zillikens D, Ludwig RJ (2016) T cells mediate autoantibody-induced cutaneous inflammation and blistering in epidermolysis bullosa acquisita. Scientific Reports 6, 38357 EP -
- Bills T, Spatz L (1977) Neutrophilic hypersegmentation as an indicator of incipient folic acid deficiency. American journal of clinical pathology 68, 263–267
- Bio-Rad Laboratories I (2016) flow-cytometry-basics-guide. https://www.bio-rad-antibodies.com/static/2016/fc-guide/flow-cytometry-basicsguide.pdf. Zugegriffen: 05. Juli 2019
- Björck L, Kronvall G (1984) Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. The Journal of Immunology 133, 969
- Bolick DT, Orr AW, Whetzel A, Srinivasan S, Hatley ME, Schwartz MA, Hedrick CC (2005) 12/15-lipoxygenase regulates intercellular adhesion molecule-1 expression and monocyte adhesion to endothelium through activation of RhoA and nuclear factorkappaB. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 25, 2301–2307
- Boll IT, Fuchs G (1970) A kinetic model of granulocytopoiesis. Experimental cell research 61, 147–152
- Bradding P, Redington AE, Djukanovic R, Conrad DJ, Holgate ST (1995) 15-lipoxygenase immunoreactivity in normal and in asthmatic airways. American journal of respiratory and critical care medicine 151, 1201–1204
- Brash AR (1999) Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. The Journal of biological chemistry 274, 23679–23682
- Briheim G, Stendahl O, Dahlgren C (1984) Intra- and extracellular events in luminoldependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. Infection and Immunity 45, 1–5
- Brinkmann V, Laube B, Abu Abed U, Goosmann C, Zychlinsky A (2010) Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. Journal of visualized experiments 36, e1724
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 303, 1532– 1535
- Brown M, Wittwer C (2000) Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. Clinical chemistry 46, 1221–1229

- Bryant RW, Bailey JM, Schewe T, Rapoport SM (1982) Positional specificity of a reticulocyte lipoxygenase. Conversion of arachidonic acid to 15-S-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid. The Journal of biological chemistry 257, 6050–6055
- Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN (2014) Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. Immunity 40, 315–327
- Campbell MS, Lovell MA, Gorbsky GJ (1995) Stability of nuclear segments in human neutrophils and evidence against a role for microfilaments or microtubules in their genesis during differentiation of HL60 myelocytes. Journal of leukocyte biology 58, 659–666
- Carestia A, Frechtel G, Cerrone G, Linari MA, Gonzalez CD, Casais P, Schattner M (2016) NETosis before and after Hyperglycemic Control in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. PloS one 11, e0168647
- Cayman Chemical Phagocytosis Assay Kit (IgG FITC). https://www.caymanchem.com/pdfs/500290.pdf. Zugegriffen: 28. Juni 2019
- Charles River Research Models (2019) C57BL/6 Mouse Model Information Sheet | Charles River. Charles River Laboratories International. https://www.criver.com/sites/default/files/resources/C57BL6MouseModelInformat ionSheet.pdf. Zugegriffen: 15. September 2020
- Chiriac MT, Roesler J, Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K, Zillikens D, Sitaru C (2007) NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. The Journal of pathology 212, 56–65
- Collins FS, Rossant J, Wurst W (2007) A mouse for all reasons. Cell 128, 9–13
- Culton DA, Liu Z, Diaz LA (2014) Autoimmune Bullous Skin Diseases—Pemphigus and Pemphigoid. In: Rose NR, MacKay IR (Hrsg) The autoimmune diseases. 5. Aufl. Elsevier AP, Amsterdam
- Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M (2005) The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. Cancer 104, 1129–1137
- Diamond B, Lipsky PE (2018) Chapter 348: Autoimmunity and Autoimmune Disease. In: Jameson JL, Kasper DL, Longo DL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J (Hrsg) Harrison's principles of internal medicine. 20. Aufl., 2510–2515. McGraw Hill Education, New York
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Putte LBA, Lipsky PE (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB j. 12, 1063–1073
- El Kebir D, Filep JG (2013) Modulation of Neutrophil Apoptosis and the Resolution of Inflammation through β 2 Integrins. Frontiers in immunology 4, 60

- Emerson MR, LeVine SM (2004) Experimental allergic encephalomyelitis is exacerbated in mice deficient for 12/15-lipoxygenase or 5-lipoxygenase. Brain research 1021, 140–145
- Feltenmark S, Gautam N, Brunnström A, Griffiths W, Backman L, Edenius C, Lindbom L, Björkholm M, Claesson H-E (2008) Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 680–685
- Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C (2003) PI3K/Akt and apoptosis: size matters. Oncogene 22, 8983–8998
- Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS, Albelda SM (2009) Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. Cancer cell 16, 183–194
- Funk CD (1996) The molecular biology of mammalian lipoxygenases and the quest for eicosanoid functions using lipoxygenase-deficient mice. Biochimica et biophysica acta 1304, 65–84
- Funk CD, Chen X-S, Johnson EN, Zhao L (2002) Lipoxygenase genes and their targeted disruption. Prostaglandins & other lipid mediators 68-69, 303–312
- Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA et al (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell death and differentiation 25, 486–541
- Gammon WR, Inman AO, Wheeler CE (1984) Differences in complement-dependent chemotactic activity generated by bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita immune complexes: demonstration by leukocytic attachment and organ culture methods. The Journal of investigative dermatology 83, 57–61
- Gammon WR, Murrell DF, Jenison MW, Padilla KM, Prisayanh PS, Jones DA, Briggaman RA, Hunt SW (1993) Autoantibodies to Type VII Collagen Recognize Epitopes in a Fibronectin-Like Region of the Noncollagenous (NC1) Domain. Journal of Investigative Dermatology 100, 618–622
- Ganguly D, Haak S, Sisirak V, Reizis B (2013) The role of dendritic cells in autoimmunity. Nature reviews. Immunology 13, 566–577
- Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR (2000) Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocytederived macrophages. Journal of immunology 164, 1663–1667
- Gronert K, Maheshwari N, Khan N, Hassan IR, Dunn M, Laniado Schwartzman M (2005) A role for the mouse 12/15-lipoxygenase pathway in promoting epithelial wound healing and host defense. The Journal of biological chemistry 280, 15267–15278

- Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. Science 265, 103– 106
- Gupta R, Woodley DT, Chen M (2012) Epidermolysis bullosa acquisita. Clinics in dermatology 30, 60–69
- Haeggström JZ, Funk CD (2011) Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. Chemical reviews 111, 5866–5898
- Hamberg M, Samuelsson B (1974) Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 71, 3400–3404
- Hammers CM, Bieber K, Kalies K, Banczyk D, Ellebrecht CT, Ibrahim SM, Zillikens D, Ludwig RJ, Westermann J (2011) Complement-fixing anti-type VII collagen antibodies are induced in Th1-polarized lymph nodes of epidermolysis bullosa acquisita-susceptible mice. Journal of immunology 187, 5043–5050
- Hayter SM, Cook MC (2012) Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease. Autoimmunity reviews 11, 754–765
- Hengen PN (1995) Purification of His-Tag fusion proteins from Escherichia coli. Trends in Biochemical Sciences 20, 285–286
- Henson PM, Johnston RB (1987) Tissue Injury in Inflammation: Oxidants, Proteinases, and Cationic Proteins. The Journal of Clinical Investigation 79, 669–674
- Hers I, Vincent EE, Tavaré JM (2011) Akt signalling in health and disease. Cellular signalling 23, 1515–1527
- Holl EK (2013) Generation of Bone Marrow and Fetal Liver Chimeric Mice. In: Allen IC (Hrsg)
 Mouse Models of Allergic Disease. Methods in Molecular Biology. Band 1032, 315–323. Humana Press, Totowa, NJ
- Holmdahl R, Malissen B (2012) The need for littermate controls. European journal of immunology 42, 45–47
- Holmes B, Page AR, Good RA (1967) Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. The Journal of Clinical Investigation 46, 1422–1432
- Howe AF, Groom T, Carter RG (1964) Use of polyethylene glycol in the concentration of protein solutions. Analytical Biochemistry 9, 443–453
- Hsiao H-M, Sapinoro RE, Thatcher TH, Croasdell A, Levy EP, Fulton RA, Olsen KC, Pollock SJ, Serhan CN, Phipps RP, Sime PJ (2013) A novel anti-inflammatory and pro-resolving role for resolvin D1 in acute cigarette smoke-induced lung inflammation. PloS one 8, e58258

- Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad
 D, Glass CK (1999) Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. Nature 400, 378–382
- Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, Herzenberg LA (1969) Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. Science 166, 747–749
- Hurley BP, Siccardi D, Mrsny RJ, McCormick BA (2004) Polymorphonuclear cell transmigration induced by Pseudomonas aeruginosa requires the eicosanoid hepoxilin A3. Journal of immunology 173, 5712–5720
- Ivanov I, Kuhn H, Heydeck D (2015) Structural and functional biology of arachidonic acid 15-lipoxygenase-1 (ALOX15). Gene 573, 1–32
- Iwata H, Bieber K, Tiburzy B, Chrobok N, Kalies K, Shimizu A, Leineweber S, Ishiko A, Vorobyev A, Zillikens D, Köhl J, Westermann J, Seeger K, Manz R, Ludwig RJ (2013) B cells, dendritic cells, and macrophages are required to induce an autoreactive CD4 helper T cell response in experimental epidermolysis bullosa acquisita. Journal of immunology 191, 2978–2988
- Kanagawa O, Xu G, Tevaarwerk A, Vaupel BA (2000) Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by gene(s) closely linked to IFN-gamma receptor loci. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 164, 3919–3923
- Kasperkiewicz M, Sadik CD, Bieber K, Ibrahim SM, Manz RA, Schmidt E, Zillikens D, Ludwig
 RJ (2016) Epidermolysis Bullosa Acquisita: From Pathophysiology to Novel
 Therapeutic Options. The Journal of investigative dermatology 136, 24–33
- Kawanishi S, Ohnishi S, Ma N, Hiraku Y, Murata M (2017) Crosstalk between DNA Damage and Inflammation in the Multiple Steps of Carcinogenesis. International journal of molecular sciences 18, 1808
- Kay AB (1991) Asthma and inflammation. Journal of Allergy and Clinical Immunology 87, 893–910
- Kayama Y, Minamino T, Toko H, Sakamoto M, Shimizu I, Takahashi H, Okada S, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Yoshimura M, Egashira K, Aburatani H, Komuro I (2009) Cardiac 12/15 lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure. The Journal of experimental medicine 206, 1565–1574
- Kim JH, Kim YH, Kim S, Noh EB, Kim S-E, Vorobyev A, Schmidt E, Zillikens D, Kim S-C (2013) 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. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 27, 224-230
- Kinder M, Wei C, Shelat SG, Kundu M, Zhao L, Blair IA, Puré E (2010) Hematopoietic stem cell function requires 12/15-lipoxygenase-dependent fatty acid metabolism. Blood 115, 5012–5022

- Klausen P, Bjerregaard MD, Borregaard N, Cowland JB (2004) End-stage differentiation of neutrophil granulocytes in vivo is accompanied by up-regulation of p27kip1 and down-regulation of CDK2, CDK4, and CDK6. Journal of leukocyte biology 75, 569–578
- Klebanoff SJ (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. Journal of leukocyte biology 77, 598– 625
- Kolaczkowska E, Kubes P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nature Reviews Immunology 13, 159–175
- Kono M, Saigo K, Matsuhiroya S, Takahashi T, Hashimoto M, Obuchi A, Imoto S, Nishiyama T, Kawano S (2018) Detection of activated neutrophils by reactive oxygen species production using a hematology analyzer. Journal of Immunological Methods 463, 122–126
- Kovács M, Németh T, Jakus Z, Sitaru C, Simon E, Futosi K, Botz B, Helyes Z, Lowell CA, Mócsai A (2014) The Src family kinases Hck, Fgr, and Lyn are critical for the generation of the in vivo inflammatory environment without a direct role in leukocyte recruitment. The Journal of experimental medicine 211, 1993–2011
- Krause W, Schewe T, Behrisch D (1975) Über das Vorkommen eines Lyse-Faktors der Mitochondrien in Kaninchenretikulozyten. Acta biologica et medica Germanica 34, 1609–1619
- Krönke G, Katzenbeisser J, Uderhardt S, Zaiss MM, Scholtysek C, Schabbauer G, Zarbock A, Koenders MI, Axmann R, Zwerina J, Baenckler HW, van den Berg W, Voll RE, Kühn H, Joosten LAB, Schett G (2009) 12/15-lipoxygenase counteracts inflammation and tissue damage in arthritis. Journal of immunology 183, 3383–3389
- Kroschwald S, Chiu C-Y, Heydeck D, Rohwer N, Gehring T, Seifert U, Lux A, Rothe M, Weylandt K-H, Kuhn H (2018) Female mice carrying a defective Alox15 gene are protected from experimental colitis via sustained maintenance of the intestinal epithelial barrier function. Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids 1863, 866–880
- Kuhn H, Banthiya S, van Leyen K (2014) Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. Biochimica et biophysica acta 1851, 308–330
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC (2015) Inflammation and Repair. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC (Hrsg) Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 9. Aufl., 69–111. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA
- Laneuville O, Corey EJ, Couture R, Pace-Asciak CR (1991) Hepoxilin A3 increases vascular permeability in the rat skin. Eicosanoids 4, 95–97
- Lapiere JC, Woodley DT, Parente MG, Iwasaki T, Wynn KC, Christiano AM, Uitto J (1993) Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. The Journal of Clinical Investigation 92, 1831–1839

- Lee TH, Horton CE, Kyan-Aung U, Haskard D, Crea AE, Spur BW (1989) Lipoxin A4 and lipoxin B4 inhibit chemotactic responses of human neutrophils stimulated by leukotriene B4 and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine. Clinical science 77, 195–203
- Leiter EH, Prochazka M, Coleman DL (1987) The non-obese diabetic (NOD) mouse. The American journal of pathology 128, 380–383
- Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN (2001) Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. Nature Immunology 2, 612–619
- Li J, Rao J, Liu Y, Cao Y, Zhang Y, Zhang Q, Zhu D (2013) 15-Lipoxygenase promotes chronic hypoxia-induced pulmonary artery inflammation via positive interaction with nuclear factor-KB. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 33, 971–979
- Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. Nature 420, 868–874
- Liu M, Boussetta T, Makni-Maalej K, Fay M, Driss F, El-Benna J, Lagarde M, Guichardant M (2014) Protectin DX, a double lipoxygenase product of DHA, inhibits both ROS production in human neutrophils and cyclooxygenase activities. Lipids 49, 49–57
- Löffler H (2009) Differenzialblutbild. In: Dörner K (Hrsg) Klinische Chemie und Hämatologie. 7. Aufl., 281–294. Thieme, Stuttgart
- Ludwig RJ (2013) Clinical presentation, pathogenesis, diagnosis, and treatment of epidermolysis bullosa acquisita. ISRN dermatology 2013
- Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, Musto A, Hardy M, Gimenez JM, Chiang N, Serhan CN, Bazan NG (2003) Novel docosanoids inhibit brain ischemiareperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. The Journal of biological chemistry 278, 43807–43817
- Marchesi VT (1961) The site of leucocyte emigration during inflammation. Quarterly journal of experimental physiology and cognate medical sciences 46, 115–118
- McCoy KD, Geuking MB, Ronchi F (2017) Gut Microbiome Standardization in Control and Experimental Mice. Current protocols in immunology 117, 23.1.1-23.1.13
- McCulloch EA, Till JE (1960) The Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells, Determined by Quantitative Marrow Transplantation into Irradiated Mice. Radiation Research 13, 115–125
- McDuffie M, Maybee NA, Keller SR, Stevens BK, Garmey JC, Morris MA, Kropf E, Rival C, Ma K, Carter JD, Tersey SA, Nunemaker CS, Nadler JL (2008) Nonobese diabetic (NOD) mice congenic for a targeted deletion of 12/15-lipoxygenase are protected from autoimmune diabetes. Diabetes 57, 199–208
- Michler GH (2019) Kompakte Einführung in die Elektronenmikroskopie: Techniken, Stand, Anwendungen, Perspektiven

- Middleton MK, Zukas AM, Rubinstein T, Jacob M, Zhu P, Zhao L, Blair I, Puré E (2006) Identification of 12/15-lipoxygenase as a suppressor of myeloproliferative disease. The Journal of experimental medicine 203, 2529–2540
- Mihai S, Chiriac MT, Takahashi K, Thurman JM, Holers VM, Zillikens D, Botto M, Sitaru C (2007) The alternative pathway of complement activation is critical for blister induction in experimental epidermolysis bullosa acquisita. Journal of immunology 178, 6514–6521
- Miltenyi Biotec Cell cycle analysis. https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ah UKEwjKrsCDj4_jAhVBEIAKHbGfBucQFjAAegQIAhAC&url=https%3A%2F%2Fwww.res earchgate.net%2Fprofile%2FSaleh_Alkarim%2Fpost%2FCan_the_gating_for_cell_cy cle_analyses_in_flow_cytometry_be_changed_for_different_samples%2Fattachme nt%2F59d63bfb79197b8077998fa9%2FAS%253A413536720310272%25401475606 245249%2Fdownload%2FAP_MACSQuantApp_CellCycle.pdf.pdf&usg=AOvVaw051c SQ5Jc2p-M_ZiCrz7me. Zugegriffen: 29. Juni 2019
- Miltenyi Biotech No-lyse whole blood analysis. https://www.miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0021610.PDF. Zugegriffen: 12. Juli 2019
- Miyoshi N, Uchida K, Osawa T, Nakamura Y (2004) A Link between Benzyl Isothiocyanate-Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis: Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinases in the Bcl-2 Phosphorylation. Cancer research 64, 2134–2142
- Nathan C (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Nature reviews. Immunology 6, 173–182
- Ness RB, Cottreau C (1999) Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. Journal of the National Cancer Institute 91, 1459–1467
- Ochi H, Morita I, Murota S (1992) Roles of glutathione and glutathione peroxidase in the protection against endothelial cell injury induced by 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid. Archives of Biochemistry and Biophysics 294, 407–411
- O'Sullivan TP, Vallin KSA, Shah STA, Fakhry J, Maderna P, Scannell M, Sampaio ALF, Perretti M, Godson C, Guiry PJ (2007) Aromatic lipoxin A4 and lipoxin B4 analogues display potent biological activities. Journal of medicinal chemistry 50, 5894–5902
- Pace-Asciak CR (2015) Pathophysiology of the hepoxilins. Biochimica et biophysica acta 1851, 383–396
- Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, Sibley RK (1991) Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. The New England journal of medicine 325, 1127–1131
- Peters AM, Roddie ME, Danpure HJ, Osman S, Zacharopoulos GP, George P, Stuttle AW, Lavender JP (1988) 99Tcm-HMPAO labelled leucocytes: comparison with 111Intropolonate labelled granulocytes. Nuclear medicine communications 9, 449–463

- Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, Boer RJ de, Borghans JAM, Tesselaar K, Koenderman L (2010) In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. Blood 116, 625–627
- Pozarowski P, Darzynkiewicz Z (2004) Analysis of cell cycle by flow cytometry. Methods in molecular biology 281, 301–311
- Pure E, Kinder M (2012) Response: hematopoietic defects in 12/15-lipoxygenase-deficient mice. Blood 119, 6174–6175
- Recke A, Trog LM, Pas HH, Vorobyev A, Abadpour A, Jonkman MF, van Zandbergen G, Kauderer C, Zillikens D, Vidarsson G, Ludwig RJ (2014) Recombinant human IgA1 and IgA2 autoantibodies to type VII collagen induce subepidermal blistering ex vivo. Journal of immunology 193, 1600–1608
- Reimer L, Kohl H (2008) Introduction: Transmission Electron Microscopy. In: Rhodes WT, Adibi A, Asakura T, Hänsch TW, Kamiya T, Krausz F, Monemar B, Venghaus H, Weber H, Weinfurter H (Hrsg) Transmission electron microscopy. 5. Aufl. Springer series in optical sciences. Band 36, 1–10. Springer, New York
- Robbins SL, Cotran RS (1979) Inflammation and Repair: Inflammation. In: Robbins SL, Cotran RS (Hrsg) Pathologic Basis of Disease, 55–90. W.B. Saunders Co., Philadelphia
- Roenigk HH (1971) Epidermolysis bullosa acquisita: Reports of three cases and review of all published cases. Arch Dermatol 103, 1–10
- Rollins WH (1904) Notes on X-light. The University Press
- Rose NR, Bona C (1993) Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). Immunology Today 14, 426–430
- Rosin MP, Anwar WA, Ward AJ (1994) Inflammation, chromosomal instability, and cancer: the schistosomiasis model. Cancer research 54, 1929s-1933s
- Rothe T, Gruber F, Uderhardt S, Ipseiz N, Rössner S, Oskolkova O, Blüml S, Leitinger N, Bicker W, Bochkov VN, Yamamoto M, Steinkasserer A, Schett G, Zinser E, Krönke G (2015) 12/15-Lipoxygenase-mediated enzymatic lipid oxidation regulates DC maturation and function. The Journal of Clinical Investigation 125, 1944–1954
- Sachs-Olsen C, Sanak M, Lang AM, Gielicz A, Mowinckel P, Lødrup Carlsen KC, Carlsen K-H, Szczeklik A (2010) Eoxins: a new inflammatory pathway in childhood asthma. The Journal of allergy and clinical immunology 126, 859-867
- Sadik CD, Kim ND, Iwakura Y, Luster AD (2012) Neutrophils orchestrate their own recruitment in murine arthritis through C5aR and FcγR signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109, E3177-E3185
- Samavedam UKSRL, Iwata H, Müller S, Schulze FS, Recke A, Schmidt E, Zillikens D, Ludwig RJ (2014) GM-CSF modulates autoantibody production and skin blistering in experimental epidermolysis bullosa acquisita. Journal of immunology 192, 559–571

- Sanchez JA, Wangh LJ (1999) New insights into the mechanisms of nuclear segmentation in human neutrophils. Journal of Cellular Biochemistry 73, 1–10
- Schewe T, Halangk W, Hiebsch C, Rapoport SM (1975) A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria. FEBS Letters 60, 149–152
- Schmalzl F, Lederer B, Braunsteiner H (1970) Atypical myeloblactic leukemia with differentiation into "paraneutrophils". Blut 20, 337–349
- Schmidt E, Zillikens D (2013) Pemphigoid diseases. The Lancet 381, 320–332
- Serhan CN (2010) Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: To resolve or not? The American journal of pathology 177, 1576–1591
- Serhan CN (2017) Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms. The FASEB Journal 31, 1273–1288
- Serhan CN, Chiang N, Dalli J (2015a) The resolution code of acute inflammation: Novel proresolving lipid mediators in resolution. Seminars in immunology 27, 200–215
- Serhan CN, Chiang N, Dalli J, Levy B d. (2015b) Lipid Mediators in the Resolution of Inflammation. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 7
- Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K (2000) Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. The Journal of experimental medicine 192, 1197–1204
- Serhan CN, Dalli J, Karamnov S, Choi A, Park C-K, Xu Z-Z, Ji R-R, Zhu M, Petasis NA (2012) Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. The FASEB Journal 26, 1755–1765
- Sesarman A, Sitaru AG, Olaru F, Zillikens D, Sitaru C (2008) Neonatal Fc receptor deficiency protects from tissue injury in experimental epidermolysis bullosa acquisita. Journal of molecular medicine 86, 951–959
- Sezin T (2016) The Role of Leukotriene B4 and Its Receptor BLT1 in Pahtogenesis of Autoantibody-Induced Skin Inflammation. Naturwissenschaftliche Dissertation, Lübeck
- Sezin T, Ferreirós N, Jennrich M, Ochirbold K, Seutter M, Attah C, Mousavi S, Zillikens D, Geisslinger G, Sadik CD (2020) 12/15-Lipoxygenase choreographs the resolution of IgG-mediated skin inflammation. Journal of autoimmunity, 102528
- Sezin T, Krajewski M, Wutkowski A, Mousavi S, Chakievska L, Bieber K, Ludwig RJ, Dahlke M, Rades D, Schulze FS, Schmidt E, Kalies K, Gupta Y, Schilf P, Ibrahim SM, König P, Schwudke D, Zillikens D, Sadik CD (2017) The Leukotriene B4 and its Receptor BLT1 Act as Critical Drivers of Neutrophil Recruitment in Murine Bullous Pemphigoid-Like Epidermolysis Bullosa Acquisita. The Journal of investigative dermatology 137, 1104–1113

- Shapiro HM (2003a) Overture: What (And What Good) Is Flow Cytometry. In: Shapiro HM (Hrsg) Practical flow cytometry. 4. Aufl., 1–2. Wiley-LISS, Hoboken, NJ
- Shapiro HM (2003b) Overture: Beginnings: Microscopy and Cytometry. In: Shapiro HM (Hrsg) Practical flow cytometry. 4. Aufl., 2–12. Wiley-LISS, Hoboken, NJ
- Shapiro HM (2003c) Overture: Flow Cytometry: Problems, Parameters, Probes and Principles. In: Shapiro HM (Hrsg) Practical flow cytometry. 4. Aufl., 18–48. Wiley-LISS, Hoboken, NJ
- Shapiro HM (2003d) Flow Sorting. In: Shapiro HM (Hrsg) Practical flow cytometry. 4. Aufl., 257–271. Wiley-LISS, Hoboken, NJ
- Shapiro HM (2003e) Parameters and Probes: Physical Parameters and Their Uses. In: Shapiro HM (Hrsg) Practical flow cytometry. 4. Aufl., 273–285. Wiley-LISS, Hoboken, NJ
- Shapiro HM (2003f) Parameters and Probes: Intrinsic Cellular Parameters. In: Shapiro HM (Hrsg) Practical flow cytometry. 4. Aufl., 285–293. Wiley-LISS, Hoboken, NJ
- Shapiro HM (2003g) Parameters and Probes: Measuring Cell Surface and Intracellular Antigens. In: Shapiro HM (Hrsg) Practical flow cytometry. 4. Aufl., 345–361. Wiley-LISS, Hoboken, NJ
- Shen FW, Saga Y, Litman G, Freeman G, Tung JS, Cantor H, Boyse EA (1985) Cloning of Ly-5 cDNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82, 7360–7363
- Shimanovich I, Mihai S, Oostingh GJ, Ilenchuk TT, Bröcker E-B, Opdenakker G, Zillikens D, Sitaru C (2004) Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. The Journal of pathology 204, 519–527
- Shrestha S, Kim S-Y, Yun Y-J, Kim J-K, Lee JM, Shin M, Song D-K, Hong C-W (2017) Retinoic acid induces hypersegmentation and enhances cytotoxicity of neutrophils against cancer cells. Immunology letters 182, 24–29
- Shrestha S, Noh JM, Kim S-Y, Ham H-Y, Kim Y-J, Yun Y-J, Kim M-J, Kwon M-S, Song D-K, Hong C-W (2016) Angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonist attenuate tumor growth via polarization of neutrophils toward an antitumor phenotype. Oncoimmunology 5, e1067744
- Sigal E, Dicharry S, Highland E, Finkbeiner WE (1992) Cloning of human airway 15lipoxygenase: identity to the reticulocyte enzyme and expression in epithelium. American Journal of Physiology-Legacy Content 262, 392 - 398
- Silverstein AM (2014) Autoimmunity: A History of the Early Struggle for Recognition. In: Rose NR, MacKay IR (Hrsg) The autoimmune diseases. 5. Aufl., 11–17. Elsevier AP, Amsterdam

- Singh NK, Rao GN (2019) Emerging role of 12/15-Lipoxygenase (ALOX15) in human pathologies. Progress in lipid research 73, 28–45
- Sitaru AG, Sesarman A, Mihai S, Chiriac MT, Zillikens D, Hultman P, Solbach W, Sitaru C (2010) T cells are required for the production of blister-inducing autoantibodies in experimental epidermolysis bullosa acquisita. Journal of immunology 184, 1596–1603
- Sitaru C (2007) Experimental models of epidermolysis bullosa acquisita. Experimental dermatology 16, 520–531
- Sitaru C, Chiriac MT, Mihai S, Büning J, Gebert A, Ishiko A, Zillikens D (2006) Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice. Journal of immunology 177, 3461–3468
- Sitaru C, Kromminga A, Hashimoto T, Bröcker EB, Zillikens D (2002a) Autoantibodies to type VII collagen mediate Fcgamma-dependent neutrophil activation and induce dermalepidermal separation in cryosections of human skin. The American journal of pathology 161, 301–311
- Sitaru C, Mihai S, Otto C, Chiriac MT, Hausser I, Dotterweich B, Saito H, Rose C, Ishiko A, Zillikens D (2005) Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. The Journal of Clinical Investigation 115, 870–878
- Sitaru C, Schmidt E, Petermann S, Munteanu LS, Bröcker E-B, Zillikens D (2002b) Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. The Journal of investigative dermatology 118, 664–671
- Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M, Harrow J, Cox T, Jackson D, Severin J, Biggs P, Fu J, Nefedov M, Jong PJ de, Stewart AF, Bradley A (2011) A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. Nature 474, 337-342
- Smyth G, Graaf C de (2015) Remove Batch Effect. In: Smyth G (Hrsg) Linear Models for Microarray Data, 187–188. https://bioconductor.riken.jp/packages/3.1/bioc/manuals/limma/man/limma.pdf. Zugegriffen: 14. September 2020
- Stein K, Stoffels M, Lysson M, Schneiker B, Dewald O, Krönke G, Kalff JC, Wehner S (2016) A role for 12/15-lipoxygenase-derived proresolving mediators in postoperative ileus: protectin DX-regulated neutrophil extravasation. Journal of leukocyte biology 99, 231–239
- Straus DS, Glass CK (2007) Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. Trends in immunology 28, 551–558
- Sun D, Funk CD (1996) Disruption of 12/15-Lipoxygenase Expression in Peritoneal Macrophages. The Journal of biological chemistry 271, 24055–24062

- Sun L, Xu Y-W, Han J, Liang H, Wang N, Cheng Y (2015) 12/15-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid activate PPARγ: a possible neuroprotective effect in ischemic brain. Journal of lipid research 56, 502–514
- Suzuki Y, Lehrer RI (1980) NAD(P)H oxidase activity in human neutrophils stimulated by phorbol myristate acetate. The Journal of Clinical Investigation 66, 1409–1418
- Swamydas M, Lionakis MS (2013) Isolation, purification and labeling of mouse bone marrow neutrophils for functional studies and adoptive transfer experiments. Journal of visualized experiments 77, e50586
- Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JAM, Koenderman L (2013) What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. Journal of leukocyte biology 94, 595–601
- Tang Y, Zhang MJ, Hellmann J, Kosuri M, Bhatnagar A, Spite M (2013) Proresolution therapy for the treatment of delayed healing of diabetic wounds. Diabetes 62, 618–627
- Taylor PR, Heydeck D, Jones GW, Krönke G, Funk CD, Knapper S, Adams D, Kühn H, O'Donnell VB (2012) Development of myeloproliferative disease in 12/15lipoxygenase deficiency. Blood 119, 6173–6174
- Thompson WG, Cassino C, Babitz L, Meola T, Berman R, Lipkin M, Freedman M (1989) Hypersegmented neutrophils and vitamin B12 deficiency. Hypersegmentation in B12 deficiency. Acta haematologica 81, 186–191
- Tzankov A, Dirnhofer S, Beham-Schmid C (2012) Normales Knochenmark und häufige reaktive Veränderungen. Der Pathologe 33, 496–507
- Uderhardt S, Herrmann M, Oskolkova OV, Aschermann S, Bicker W, Ipseiz N, Sarter K, Frey B, Rothe T, Voll R, Nimmerjahn F, Bochkov VN, Schett G, Krönke G (2012) 12/15lipoxygenase orchestrates the clearance of apoptotic cells and maintains immunologic tolerance. Immunity 36, 834–846
- van Putten EG, Akbulut D, Bertolotti J, Vos WL, Lagendijk A, Mosk AP (2011) Scattering lens resolves sub-100 nm structures with visible light. Physical review letters 106, 193905
- Vogt PK, Hart JR, Gymnopoulos M, Jiang H, Kang S, Bader AG, Zhao L, Denley A (2011) Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K): The Oncoprotein. Current topics in microbiology and immunology 347, 79–104
- Wegener H, Paulsen H, Seeger K (2014) The cysteine-rich region of type VII collagen is a cystine knot with a new topology. The Journal of biological chemistry 289, 4861–4869
- Wen Y, Gu J, Chakrabarti SK, Aylor K, Marshall J, Takahashi Y, Yoshimoto T, Nadler JL (2007) The role of 12/15-lipoxygenase in the expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in macrophages. Endocrinology 148, 1313–1322
- Westerman DA, Evans D, Metz J (1999) Neutrophil hypersegmentation in iron deficiency anaemia: a case-control study. British journal of haematology 107, 512–515

- Wong JY, Filippi AR, Dabaja BS, Yahalom J, Specht L (2018) Total Body Irradiation: Guidelines from the International Lymphoma Radiation Oncology Group (ILROG). International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics 101, 521–529
- Wong SL, Demers M, Martinod K, Gallant M, Wang Y, Goldfine AB, Kahn CR, Wagner DD (2015) Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. Nature medicine 21, 815–819
- Woodley DT, Briggaman RA, O'Keefe EJ, Inman AO, Queen LL, Gammon WR (1984) Identification of the skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. The New England journal of medicine 310, 1007–1013
- Woodley DT, Ram R, Doostan A, Bandyopadhyay P, Huang Y, Remington J, Hou Y, Keene DR, Liu Z, Chen M (2006) Induction of epidermolysis bullosa acquisita in mice by passive transfer of autoantibodies from patients. The Journal of investigative dermatology 126, 1323–1330
- Wu S-H, Liao P-Y, Yin P-L, Zhang Y-M, Dong L (2009) Inverse temporal changes of lipoxin A4 and leukotrienes in children with Henoch-Schönlein purpura. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 80, 177–183
- Wurst W, Friedel RH, Wefers B, Kühn R (2011) Generating Conditional Knockout Mice. In: Hofker MH, van Deursen J (Hrsg) Transgenic Mouse Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. Band 693, 205–231. Humana Press, Totowa, NJ
- Xu Z-Z, Ji R-R (2011) Resolvins are potent analgesics for arthritic pain. British journal of pharmacology 164, 274–277
- Yamada T, Tani Y, Nakanishi H, Taguchi R, Arita M, Arai H (2011) Eosinophils promote resolution of acute peritonitis by producing proresolving mediators in mice. The FASEB Journal 25, 561–568
- Yang H, Biermann MH, Brauner JM, Liu Y, Zhao Y, Herrmann M (2016) New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation. Frontiers in immunology 7, 302
- Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU (2009) Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. Cell death and differentiation 16, 1438–1444

7. Anhänge

7.1 Materialien

7.1.1 Reagenzien

Reagenzien	Katalognummer	Hersteller
4 % PFA: Roti-Histofix (4%)	P087.2	Carl Roth
Agarose	840004	Biozym
Assay Puffer Tablette	10009322	Cayman Chemical
D-(+)-Glucose Lösung (10 %)	G8644	Sigma Aldrich
DAPI Fluoromount-G	0100-20	Southern Biotech
DMSO	A994.1	Roth
DNA Gel Loading Dye	R0611	Thermo Fisher Scientific
DNS-Farbstoff: Intas HD Green Plus	ISII-HDGreen Plus	Intas Science Imaging Instruments
dNTP Mix 10 mM	18427088	Thermo Fisher Scientific
Donkey Serum	017-000-121	Jackson Immuno Research
EDTA Lösung 0.5M pH 8	A3145.0500	AppliChem
Eisessig	64-19-7	Merck
Ethanol 70 %	T913.3	Carl Roth
Ethanol 96 %	T171.4	Carl Roth
Fötales Kälberserum	S0615	Merck
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	SM0323	Thermo Fisher Scientific
Glycin	3908.2	Roth
Humanes Serum Albumin	A1653	Sigma Aldrich
Ketaminhydrochlorid	K-2753	Sigma Aldrich
Ladepuffer	R0611	Thermo Fisher Scientific
Latex Partikel-Kaninchen IgG-FITC Komplex	400291	Cayman Chemical
Lucigenin	ALX-620-061- M050	Enzo
Luminol	A4685	Sigma Aldrich
Methanol	T169.1	Carl Roth
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	10028-24-7	Merck

Reagenzien	Katalognummer	Hersteller
NaCl	9265.3	Carl Roth
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	13472-35-0	Merck
Natriumcarbonat	497-19-8	Merck
Natriumhydrogencarbonat	144-55-8	Merck
Natriumhydroxid	1310-73-2	Merck
Penicillin/Streptomycin 100 x	10378-016	Gibco
Phire Hot Start II DNS Polymerase mit 5 x Reaktionspuffer	F122S	Thermo Fisher Scientific
РМА	10008014	Cayman Chemicals
Polyethylenglycol 20.000	33238.02	Serva
Polyoxyethylene sorbitan moonolaurate (Tween 20)	P1379	Sigma Aldrich
Protein G Resin	L00209	GenScript
Salzsäure 25 %	1003161000	Merck
TRIS	37190.02	Serva
Triton X-100	3051.2	Carl Roth
Trypanblau	T8154	Sigma Aldrich
Xylazinhydrochlorid	X-1251	Sigma Aldrich

7.1.2	Antikörper
-------	------------

Name	Katalognummer	Verwendung	Hersteller
anti-Maus CD19-APC-Vio770	130-102-310	FC	Miltenyi Biotec
anti-Maus CD45-VioBlue	130-102-430	FC	Miltenyi Biotec
anti-Maus Ly-6C-PE	130-102-391	FC	Miltenyi Biotec
anti-MausCD11b-APC-Vio770	130-109-288	FC	Miltenyi Biotec
anti-MausLy-6G-PerCP-Vio700	130-103-791	FC	Miltenyi Biotec
APC Mouse anti-Mouse CD45.1	558701	FC	Becton, Dickinson and Company (BD)
CD3-PE-Vio-770, Maus	130-109-839	FC	Miltenyi Biotec
Esel-anti-Kaninchen-IgG-Alexa- Fluor-594	711-585-152	ICC	Jackson Immuno Research
Esel-anti-Maus-IgG-Alexa-Fluor- 488	715-545-151	ICC	Jackson Immuno Research
FcR Block Reagenz, Maus	130-092-575	FC	Miltenyi Biotec
FITC Moue anti-Mouse CD45.2	553772	FC	BD
Kaninchen Anti MPO	A0398	ICC	Dako Agilent
Maus-anti-H3	NBP1-30141SS	ICC	Novus Biologicals
PE Rat anti-Mouse Ly6G	551461	FC	BD

7.1.3 Primer

Primer	Basensequenz	Hersteller
CSD loxF 100 μM	GAG ATG GCG CAA CGC AAT TAA TG	Biomers.net
CSD-gene-F 100 μM	CAG TGT CTC CAG CTT CTT CCC TAC G	Biomers.net
CSD-gene-R 100 μM	CAC CTC AGC CTC TTC ACC TAA AGT ATC	Biomers.net
CSD-gene-ttr 100 μM	TGT CAC CTC AAC CAA GAG TGA GAG G	Biomers.net
oIMR1084	GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC	Biomers.net
oIMR1085	GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT	Biomers.net
oIMR7338	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	Biomers.net
oIMR7339	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	Biomers.net

7.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Accu-jet- Pro-Pipette	BRAND
Biologische Sicherheitswerkbank	NuAire
BioPhotometer D30	Eppendorf
Diamantmesser Ultracut E	Leica
Durchflusszytometer: BD FACSAria II	BD
Durchflusszytometer: MACSQuant	Miltenyi Biotech
Elektronenmikroskop JEM-1011	Jeol
Elektrophose-Netzgerät: Consort E844	Consort
Flockeneisbereiter AF 156	Scotsman
Gefrierschrank, -20°C, GNP5255	Liebherr Hausgeräte
Gefrierschrank, -80°C, MDF-382	Sanyo Electric
Geldokumentation: E-Box CX5.TS	Vilber Lourmat
Infinite M200 PRO ELISA reader	Thermo Fisher Scientific
Inkubator Galaxy 170 S	New Brunswick
Keyence Mikroskop: BZ-9000E	Keyence Deutschland
Kontrastierautomat EM AC20	Leica
Kühlschrank	Siemens
Mehrfachdispenser: HandyStep S	BRAND
Mikrowelle	Clatronic International
Mikrozentrifuge: Micro Star 17R	VWR International
Mini-Shaker Modell Kühner	B. Braun Melsungen
NanoDrop 2000c Photometer	Thermo Fisher Scientific
neoVAQ Maxi Absaugsystem	Neolab
Neubauer-Zählkammer	Laboroptik
pH-meter: HI208	HANNA instruments
Präzisionswaage: ABS/ABJ-BAdef-1019	KERN-Sohn
Röhrchenroller	Hassa Laborbedarf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Transferpipette (10 μl, 100 μl, 200μl, 1000 μl)	BRAND
Vortex Genie	Scientific Industries

Gerät	Hersteller
Vortexmischer: Vortex Genie2	Scientific Industries
Zentrifuge: Eppendorf 5810R	Eppendorf

7.1.5 Verbrauchsmaterial

Artikel	Hersteller
175 cm ² Zellkulturflaschen	Sarstedt
30 μm Zellsieb (#130-041-407)	Miltenyi Biotech
30 K Zentriugationsfilter (#UFC903024)	Amicon
Dako-Stift	Dako Deutschland
Dialysierschlauch (#1785.1)	Roth
ELISA stark bindende 96-Mikrotiterplatte	Thermo Fisher Scientific
Filtropur V50 0,2µm Filter 500ml	Sarstedt
Injektionsspritze (1 ml, 5 ml, 20 ml)	BD
Kanüle (26G)	BD
Magnetische Trennsäule MS (#130-042-201)	Miltenyi Biotech
PCR-Röhrchen 0,2 μl 8er Kette	Sarstedt
Pipettenspitzen (10 μl, 100 μl, 1000 μl)	Sarstedt
Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträger	Sigma Aldrich
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Serologische Pipette (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Skalpell: Feather Einmalskalpell	Feather Safety Razor
Zentrifugenröhrchen (15 μl, 50 μl)	Sarstedt

7.1.6	Kommerziell	erhältliche Puffer,	Lösungen	und Kits
-------	-------------	---------------------	----------	----------

Name		Katalognummer	Hersteller
1 HEPES		L1613	Biochrom
1x PBS pH 7,2		20012019	Invitrogen - Thermo Fisher Scientific
autoMACS Rinsing	Solution	130-091-222	Miltenyi Biotech
HBSS-Puffer		14025-050	Gibco
MACS BSA Stock S	olution	130-091-376	Miltenyi Biotech
Neutrophilen Maus	Isolierungskit,	130-097-658	Miltenyi Biotech
Phagocytosis Assa	y Kit	500290	Cayman Chemical
RPMI 1640 with L-	glutamine	BE12-702F	Lonza Cologne

7.1.7 Software

Software	Version
BZ-HybridCellCount	1.01.0000
BZ-II Analyzer Software	1.02.0000
BZ-Viewer	1.00.0000
FlowJo	10.4.2
GraphPad Prism	8.2.1.441

7.1.8 Biologisches Material

Biologisches Material	Hersteller
Jurkat Zellen (Klon E6-1, ATCC TIB 152)	ATCC
mCOL7c Serum DE16014	Eurogentec

Name	Zusammensetzung
0,1 M Glycin-Puffer pH 2,8 (4 °C)	7,507 g Glycin
	1 l destilliertes Wasser
	pH auf 2,8 mit HCL angepasst
1 M NaCl (RT)	58,44 g NaCl
	1 l destilliertes Wasser
1 M Tris Base pH 9,0 (RT)	121,1 g TRIS
	1 l destilliertes Wasser
1x TAE	40 ml 50 x TAE
	1960 ml destilliertes Wasser
10x PBS	450.0 g NaCl
	87.0 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	10.17 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
	5l demineralisiertes Wasser
1x PBS pH 7,2	100 ml 10x PBS
	900 ml demineralisiertes Wasser
	pH auf 7,2 angepasst mit 2 M NaOH
50 x TAE	242 g TRIS
	57,1 ml Eisessig
	200 ml 0,5 M EDTA pH 8
	1 l destilliertes Wasser
Assay-Puffer	1 Assay Puffer Tablette
	100 ml demineralisiertes Wasser
Blockpuffer	45 ml PBST
	5 ml Normales Eselserum
CL-Medium	5 ml FCS
	1 ml 0,1 g/ml Glucose
	12,5 ml HEPES 1M
	500 ml RPMI 1640 ohne Phenolrot

7.1.9 Selbst hergestellte Puffer und Medien

Name	Zusammensetzung
Coating-Puffer	0,75 g Na ₂ CO ₃ 1,5 g NaHCO ₃ 500 ml destilliertes Wasser pH auf 9,6 anpassen
Färbelösung	9,9 ml Probenpuffer
	100 μl DAPI
	10 μl Triton X-100
Ketamin/Xylazin	10 mg/ml Ketamin
	1,5 mg/ml Xylazin
Kulturmedium	44 ml RPMI-Puffer
	5 ml FCS
	0,5 ml 1 M HEPES-Puffer
	0,5 ml 100 x Penicillin/Streptomycin
MACS-Puffer	475 ml autoMACS Rinsing Solution
	25 ml MACS BSA Stock Solution
PBST	50 ml PBS
	25 μl Tween20
Probenpuffer	0,5 g Glucose
	500 ml PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²
	Durch 22 μm Sieb gefiltert
20 mM Tris pH 7,2	2,422 g TRIS
	1 l destilliertes Wasser
	pH auf 7,2 anpassen
20 mM Tris + 0,5 M NaCl pH 7,2	2,422 g TRIS
	29,22 g NaCl
	1 l destilliertes Wasser
	pH auf 7,2 anpassen
Triton-Puffer (850 mM NaCl + 0,1 % Triton)	49,67 g NaCl
	1 ml Triton X-100
	1 l destilliertes Wasser

7.2 Sonstiges

7.2.1 Tabelle: Substrate und Produkte der 12/15-LOX und deren biologische Funktion

Tabelle 4: Substrate und Produkte der 12/15-LOX und deren biologische Funktion

Substrat	Direktes Produkt	Endprodukt	Biologische Funktion
15(S)-НРЕТЕ	Floutet	15(S)-НЕТЕ	 Steigern der PPAR-γ-Aktivität mit konsekutiver Erhöhung der CD36 Expression (Huang et al. 1999)
		Eoxine	• Proinflammatorisch, erhöhen Permeabilität der Endothelschicht (Feltenmark et al. 2008)
	Contraction of the second seco	• An Asthma beteiligt (Sachs-Olsen et al. 2010)	
	бон	Hepoxiline	Proinflammatorisch (Pace-Asciak 2015) Chemetetischen Effekt auf DNAN (Uurleu et al. 2004)
AA			 Erhöhen die vaskuläre Permeabilität (Laneuville et al. 1991)
		Lipoxine	 Antiinflammatorisch, hemmen Transmigration von PMN (Lee et al. 1989) Stimulieren Efferozytose von PMN durch Md (Godson et al. 2000)
		HO OH O OH	 Initiieren die Bindung von Chemokinen an apoptotische PMN und T-Zellen und
		ÖH .	 beschleunigen so deren Elimination (Ariel et al. 2006). Induzieren Apoptose in inflammatorischen PMN (El Kebir und Eilen 2013)
	12(S)-НРЕТЕ	12(S)-НЕТЕ	 Proinflammatorisch, aktivieren NF-кB, steigern IL-6 Produktion (Bolick et al. 2005; Wen et al. 2007)

7. Anhänge

Substrat	Direktes Produkt	Endprodukt	Biologische Funktion
Linolsäure	13(S)-НРОДЕ	13(S)-HODE	 Antiinflammatorisch durch Steigerung der PPAR-γ-Aktivität mit konsekutiver Erhöhung der CD36 Expression (Huang et al. 1999; Straus und Glass 2007)
		Resolvine	 Beschleunigen Wundheilung (Tang et al. 2013) Reduzieren Schmerz (Xu und Ji 2011) Reduzieren Produktion proinflammatorischer Zytokine, verstärken Efferozytose von PMN durch Mφ und beschleunigen Resolution (Hsiao et al. 2013)
DHA	17(S)-НРDНА	Protectine	 Inhibieren Leukozyteninfiltration, NF-κB Aktivierung und COX-2 Expression (Marcheselli et al. 2003) Inhibieren Zytokinproduktion (Bannenberg et al. 2005)
		Maresine	 Limitieren PMN Infiltration, stimulieren Efferozytose von PMN durch Mφ, reduzieren Schmerz, beschleunigen Regeneration (Serhan et al. 2012)
EPA	15(S)-НРЕРА СООН ООН	15(S)-НЕРА	• Antiinflammatorische und die Resolution von Entzündung begünstigende Effekte (Singh und Rao 2019)

Aus Gründen der Übersicht wurde auf eine weitere Klassifizierung der Endprodukte in Untergruppen verzichtet. Die biologische Funktion der Endprodukte stellt nur eine Auswahl dar und ist nicht vollständig. (Tabelle modifiziert nach Singh und Rao 2019, Strukturformeln aus O'Sullivan et al. 2007; Bannenberg und Serhan 2010; Singh und Rao 2019)

7.2.2 Statistik ROS-Freisetzung

Tabelle 5: Statistik des ROS-Freisetzungs-Assays

Probe	n	Mittelwert	SD	SEM	p-Wert WT	p-Wert gegens.
	L	uminol ohne S	Stimulation	(ІК)		8-8-101
Alox15 ^{-/-} SSC ^{low}	4	-0,0011	0,0111	0,0055	>0,9999	0,2072
Alox15 ^{-/-} SSC ^{high}	3	0,1324	0,0211	0,0121	0,0260	
	Lu	icigenin ohne	Stimulatior	n (IK)		
Alox15 ^{-/-} SSC ^{low}	4	-0,0147	0,0189	0,0094	>0,9999	0,0260
Alox15 ^{-/-} SSC ^{high}	3	0,2034	0,0304	0,0175	0,2072	
	Lui	minol ohne St	imulation (I	PMA)		
Alox15 ^{-/-} SSC ^{low}	4	-0,0049	0,0278	0,0139	>0,9999	0,2072
Alox15 ^{-/-} SSC ^{high}	3	0,3163	0,1099	0,0634	0,0260	
	Luc	igenin ohne Si	timulation	(PMA)	I	
Alox15 ^{-/-} SSC ^{low}	4	-0,0330	0,0473	0,0237	>0,9999	0,0260
Alox15 ^{-/-} SSC ^{high}	3	0,7177	0,3193	0,1843	0,2072	
	Lumi	nol ohne Stim	ulation (IK	+ PMA)	I	
Alox15 ^{-/-} SSC ^{low}	4	-0,0030	0,0177	0,0088	>0,9999	0,2072
Alox15 ^{-/-} SSC ^{high}	3	0,2045	0,0442	0,0255	0,0260	
	Lucige	enin ohne Stin	nulation (IK	+ PMA)	I	
Alox15 ^{-/-} SSC ^{low}	4	-0,0162	0,0210	0,0105	>0,9999	0,0260
Alox15 ^{-/-} SSC ^{high}	3	0,2970	0,0848	0,0490	0,2072	
	l	Luminol mit St	timulation (IK)	I	
Alox15 ^{-/-} SSC ^{low}	4	1,208	0,3405	0,1703	>0,9999	0,1378
Alox15 ^{-/-} SSC ^{high}	4	3,646	0,4767	0,2384	0,0156	
Lucigenin mit Stimulation (IK)						
Alox15 ^{-/-} SSC ^{low}	4	1,109	0,3520	0,1760	>0,9999	0,1378
Alox15 ^{-/-} SSC ^{high}	4	3,683	0,8637	0,4319	0,0156	
	Lu	iminol mit Stir	mulation (P	MA)	1	
Alox15 ^{-/-} SSC ^{low}	4	1,969	0,5367	0,2683	0,3309	0,3309
Alox15 ^{-/-} SSC ^{high}	4	4,183	0,9271	0,4636	0,0042	

Probe	n	Mittelwert	SD	SEM	p-Wert	p-Wert	
					WT	gegens.	
	Lucigenin mit Stimulation (PMA)						
Alox15 ^{-/-} SSC ^{low}	4	1,373	0,3550	0,1775	0,8168	0,4870	
Alox15 ^{-/-} SSC ^{high}	4	2,430	0,8193	0,4096	0,0378		
	Lum	inol mit Stim	ulation (IK +	PMA)			
Alox15 ^{-/-} SSC ^{low}	4	1,680	0,3334	0,1667	0,3309	0,3309	
Alox15 ^{-/-} SSC ^{high}	4	3,494	0,7915	0,3958	0,0042		
Lucigenin mit Stimulation (IK + PMA)							
Alox15 ^{-/-} SSC ^{low}	4	1,636	0,1828	0,0848	0,1738	0,9547	
Alox15 ^{-/-} SSC ^{high}	4	3,156	1,168	0,5841	0,0114		

7. Anhänge

Die dargestellten Werte beziehen sich auf die nAUC. Die Werte für WT sind nicht angegeben, da sie auf 0 bzw. 1 normalisiert wurden. Der p-Wert WT entspricht dem p-Wert gegenüber der WT Kontrolle; p-Wert gegens. Entspricht dem p-Wert zwischen *Alox15^{-/-}* SSC^{low} und *Alox15^{-/-}* SSC^{high}. Die p-Werte entsprechen den angepassten p-Werten nach Korrektur der Alphafehler-Kumulierung durch den Dunns Test. Da die Daten normalisiert wurden, unterscheiden sich die Mittelwerte, SD und SEM der nicht stimulierten *Alox15^{-/-}* SSC^{low} und SSC^{high} PMN je nach Stimulanz. Beim Kruskal-Wallis-Test ist jedoch nicht der absolute Wert, sondern die Reihenfolge der Werte von Bedeutung. Da zur Normalisierung für die drei Stimulierungen die gleichen nicht stimulierten AUC-Werte verwendet wurden, unterscheidet sich der p-Wert zwischen den drei Stimulierungen nicht.

7.2.3 Statistik der Leukozytenmigration im Blut in experimenteller EBA

		Kombination	Tag 0	Tag 6	Tag 10	Tag 14	Tag 18	Tag 22
	en	$WT \rightarrow WT vs. AI \rightarrow AI$	***	***	**	***	**	**
en		$WT \rightarrow WT \text{ vs. } WT \rightarrow AI$	*	ns	ns	ns	ns	ns
zyt	Ē	$WT \rightarrow WT \text{ vs. } AI \rightarrow WT$	***	***	**	***	**	**
ko	ese	$AI \rightarrow AI$ vs. WT $\rightarrow AI$	****	ns	**	***	***	**
Leu	60	$AI \rightarrow AI$ vs. $AI \rightarrow WT$	ns	ns	ns	ns	ns	ns
		$WT \rightarrow A/vs. A/ \rightarrow WT$	***	ns	*	***	***	***
		$WT \rightarrow WT vs. AI \rightarrow AI$	**	**	*	**	**	ns
olut		$WT \rightarrow WT \text{ vs. } WT \rightarrow AI$	ns	ns	ns	ns	ns	ns
bsd		$WT \rightarrow WT vs. AI \rightarrow WT$	**	**	ns	**	**	ns
Na		$AI \rightarrow AI$ vs. WT $\rightarrow AI$	ns	ns	*	*	*	ns
Σ		$AI \rightarrow AI$ vs. $AI \rightarrow WT$	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<u> </u>		$WT \rightarrow A/vs. A/ \rightarrow WT$	*	ns	*	*	*	****
		WT \rightarrow WT vs. $AI \rightarrow AI$	**	***	ns	ns	ns	ns
itiv		$WT \rightarrow WT \text{ vs. } WT \rightarrow AI$	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ela		$WT \rightarrow WT vs. AI \rightarrow WT$	**	ns	ns	ns	ns	ns
z		$AI \rightarrow AI$ vs. WT $\rightarrow AI$	*	**	ns	ns	ns	**
Σ		$AI \rightarrow AI$ vs. $AI \rightarrow WT$	ns	**	ns	ns	*	ns
_		$WT \rightarrow A/vs. A/ \rightarrow WT$	ns	ns	ns	ns	ns	ns
		WT \rightarrow WT vs. $AI \rightarrow AI$	ns	ns	ns	ns	ns	ns
en	ىد	$WT \rightarrow WT \text{ vs. } WT \rightarrow AI$	ns	ns	ns	ns	ns	ns
zyt	.nlc	$WT \rightarrow WT vs. AI \rightarrow WT$	ns	ns	ns	ns	ns	*
ouo	bsd	$AI \rightarrow AI$ vs. WT $\rightarrow AI$	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ĕ	σ	$AI \rightarrow AI$ vs. $AI \rightarrow WT$	ns	ns	ns	ns	ns	**
		$WT \rightarrow A/vs. A/ \rightarrow WT$	ns	ns	ns	ns	ns	*
		$WT \rightarrow WT vs. AI \rightarrow AI$	****	****	****	****	****	****
en		$WT \rightarrow WT \text{ vs. } WT \rightarrow AI$	ns	ns	ns	ns	ns	ns
zyt	ti√	$WT \rightarrow WT vs. AI \rightarrow WT$	****	****	****	****	****	****
ouo	<u>e</u>	$AI \rightarrow AI$ vs. WT $\rightarrow AI$	****	****	****	****	****	****
Ĕ	_	$AI \rightarrow AI$ vs. $AI \rightarrow WT$	ns	ns	ns	ns	ns	****
		$WT \rightarrow A/vs. A/ \rightarrow WT$	****	****	****	****	****	****
		$WT \rightarrow WT vs. AI \rightarrow AI$	****	**	**	*	***	*
c	Ļ	$WT \rightarrow WT \text{ vs. } WT \rightarrow AI$	*	ns	ns	ns	ns	ns
lle	nlc	$WT \rightarrow WT vs. AI \rightarrow WT$	***	*	*	ns	*	*
-Ze	bsd	$AI \rightarrow AI$ vs. WT $\rightarrow AI$	****	ns	**	****	***	**
F	σ	$AI \rightarrow AI$ vs. $AI \rightarrow WT$	**	*	ns	*	**	ns
		$WT \rightarrow A/vs. A/ \rightarrow WT$	*	ns	ns	****	**	**
		$WT \rightarrow WT vs. AI \rightarrow AI$	ns	ns	ns	ns	ns	ns
en	ellen lativ	$WT \rightarrow WT \text{ vs. } WT \rightarrow AI$	ns	**	ns	ns	ns	*
elle		$WT \rightarrow WT \text{ vs. } AI \rightarrow WT$	****	****	****	****	****	****
Z-T	P	$AI \rightarrow AI$ vs. WT $\rightarrow AI$	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	$AI \rightarrow AI$ vs. $AI \rightarrow WT$	****	***	****	**	****	****	

Tabelle 6: Statistik der Leukozytenmigration im Blut im Zeitverlauf der experimentellen EBA

7. Anhänge

			initiange				
	WT \rightarrow A/vs. A/ \rightarrow WT	****	ns	***	****	****	****
	$WT \rightarrow WT vs. AI \rightarrow AI$	***	**	**	***	*	**
ل	$WT \rightarrow WT \text{ vs. } WT \rightarrow AI$	*	ns	ns	ns	ns	ns
ille.	$WT \rightarrow WT \text{ vs. } A I \rightarrow WT$	***	**	**	***	*	**
-Ze bsd	$AI \rightarrow AI$ vs. WT $\rightarrow AI$	***	ns	**	***	**	**
a a	$AI \rightarrow AI$ vs. $AI \rightarrow WT$	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	$WT \rightarrow A/vs. A/ \rightarrow WT$	***	ns	**	**	**	**
.2	$WT \rightarrow WT vs. A \rightarrow A $	****	****	****	****	****	****
ilat	$WT \rightarrow WT \text{ vs. } WT \rightarrow AI$	**	ns	ns	ns	ns	ns
l re	$WT \rightarrow WT \text{ vs. } A I \rightarrow WT$	****	****	****	****	****	****
ller	$AI \rightarrow AI$ vs. WT $\rightarrow AI$	****	****	****	****	****	****
-Ze	$AI \rightarrow AI$ vs. $AI \rightarrow WT$	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ė	$WT \rightarrow A/vs. A/ \rightarrow WT$	****	****	****	****	****	****

8. Danksagung

Ohne die Hilfe verschiedener Personen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen:

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Christian Sadik für die Überlassung des Themas. Seine zahlreichen Anregungen und Förderungen waren mir eine wichtige Hilfe.

Außerdem danke ich dem Direktor des Instituts für Dermatologie Herrn Prof. Dr. Detlef Zillikens für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in diesem Institut durchführen zu können.

Ein besonderer Dank geht zudem an meine Betreuerin Frau Dr. Tanya Sezin, die mich das wissenschaftliche Arbeiten im Labor lehrte und mich bei zahlreichen Experimenten unterstützte.

Auch danke ich meiner zweiten Betreuerin Frau Dr. Sripriya Murthy, die mir durch viele Gespräche und inhaltlichen Anregungen helfend zur Seite stand.

Ein weiterer Dank geht an Sadegh Mousavi für die technische Unterstützung sowie die Hilfe bei der Anfertigung von histologischen Präparaten.

Ferner möchte ich Dr. Tillmann Vollbrandt für die Unterstützung bei der Isolierung von Neutrophilen sowie Prof. Dr. Peter König und Harry Manfeldt für die Hilfe bei der Anfertigung und Auswertung elektronenmikroskopischer Bilder danken.

Dr. Yask Gupta danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Daten.

Ich danke Prof. Dr. Cassian Sitaru und PD Dr. Katja Bieber für die Erlaubnis, ihre Grafiken in modifizierter Form in dieser Arbeit verwenden zu dürfen.

Ebenfalls danke ich Rosemarie Castera für ihre Unterstützung bei der Erstellung zweier Grafiken.

Zu Beginn meiner Zeit im Labor habe ich nicht erwartet, dass mir diese Arbeit so viel Freude bereiten würde. Dies wäre ohne das fantastische Team der Arbeitsgemeinschaft Sadik nicht möglich gewesen. Ich danke den Teammitgliedern sowohl für die inhaltliche Unterstützung als auch dafür, dass sie mir diese Zeit so unvergesslich machten.

Zuletzt danke ich meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden für den Rückhalt, die Unterstützung und ihre Geduld.

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Till Malte Seutter

Geburtsdatum: 19.06.1993

Geburtsort: Bad Oldesloe

Studium



10/2013	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität		
	zu Lübeck		
08/2015	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung; Note: sehr gut		
04/2019	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung; Note: gut		
12/2020	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung; Note: sehr gut		
Praktisches Jahr			
11/2019 - 03/2020	Innere Medizin – Westküstenklinikum Heide		
03/2020 - 07/2020	Neurologie – Segeberger Kliniken		
07/2020 - 10/2020	Chirurgie – Westküstenklinikum Heide		
Promotion			
08/2017	Beginn der Promotion unter Prof. Dr. Christian Sadik, AG		
	Angeborene Immunität		
08/2017 - 07/2018	Durchführung der Experimente		
10/2017 - 03/2018	Stipendium der KFO in Kooperation mit dem		
	Graduiertenkolleg 1727		

Publikationen

- Sezin T, Murthy S, Attah C, Seutter M, Holtsche MM, Hammers CM, Schmidt E, Meshrkey F, Mousavi S, Zillikens D, Nunn MA, Sadik CD (2019) Dual inhibition of complement factor 5 and leukotriene B4 synergistically suppresses murine pemphigoid disease. JCI insight 4, e128239
- Sezin T, Ferreirós N, Jennrich M, Ochirbold K, **Seutter M**, Attah C, Mousavi S, Zillikens D, Geisslinger G, Sadik CD (2020) 12/15-Lipoxygenase choreographs the resolution of IgG-mediated skin inflammation. Journal of autoimmunity, 102528
- Schilf P, Künstner A, Olbrich M, Waschina S, Fuchs B, Galuska CE, Braun A, Neuschütz K,
 Seutter M, Bieber K, Hellberg L, Sina C, Laskay T, Rupp J, Ludwig RJ, Zillikens D,
 Busch H, Sadik CD, Hirose M, Ibrahim SM (2021) A Mitochondrial Polymorphism
 Alters Immune Cell Metabolism and Protects Mice from Skin Inflammation. IJMS 22:1006