

Aus dem Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Hauke Busch

Etablierung einer Methode zur Isolierung von IgM-Antikörpern aus murinem Serum

-Untersuchungen zur Relevanz von IgM bei der Entstehung der
experimentellen Epidermolysis bullosa acquisita-

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

-Aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von

Rebecca Gembicki

aus Eutin

ausgegeben und betreut von

PD Dr. rer. physiol. Katja Bieber

Lübeck 2021

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. physiol. Katja Bieber

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Tobias Bäumer

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 28.02.2022

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
α (A)	Alpha
ABCs	Altersassoziierte B-Zellen
aq. dest.	Aqua dest./destilliertes Wasser
Ag	Antigen
AG	Arbeitsgemeinschaft
Ak	Antikörper
AIBD	Bullöse Autoimmundermatose
APRIL	A Proliferation-inducing Ligand
APS	Ammoniumpersulfat
BAFF	B-cell Activating Factor
BP	Bullöses Pemphigoid
BP180	Basalmembranprotein 180
BP230	Basalmembranprotein 230
BCR	B-Zell-Rezeptor
BMZ	Basalmembranzone
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
B-Zelle	B-Lymphozyt („B“ für <i>Bursa fabricii</i>)
B-1-Zelle	B-1-Lymphozyt („B“ für <i>Bursa fabricii</i>)
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C1q	Komplementfaktor 1q
C3	Komplementfaktor 3
C5	Komplementfaktor 5
C5a	Spaltprodukt von C5 durch Enzym C5-Konvertase
ca.	Circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	Cluster of Differentiation
CD18	Cluster of Differentiation Typ18
CD20	Cluster of Differentiation Typ20
CE	Cellulose Ester
CL	Chemilumineszenz
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Col7	Kollagen Typ7
Col 17	Kollagen Typ17
C _H	Konstante Domäne der schweren Kette des Antikörpers
C _L	Konstante Domäne der leichten Kette des Antikörpers
CXCL1/2	C-X-C-(Chemokin-)Motiv-Ligand 1/2
δ (D)	Delta
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindolhydrochlorid
DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DEJ	Dermoepidermale Junktionszone
DIF	Direkte Immunfluoreszenz
DMAG	17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
Dsg1	Desmoglein 1
Dsg3	Desmoglein 3
E	Eluat
ε (E)	Epsilon
EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
EBA-Serum	Serum immunisierter (mCol7 ^{VWFA2} -Titermax) Mäuse
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
et al.	Und andere
Flii	Flightless-1
FT/F	Flow through/Durchfluss
Fab	Antigenbindendes Fragment
Faktor B	Komplementfaktor B
Fc	Kristallisierbares Fragment des Antikörpers
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Fcy	Fcy-(IgG)-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
xg	Formelzeichen der Fallbeschleunigung
g	Gramm
GmbH & Co.	Gesellschaft mit beschränkter Haftung & Compagnie
γ (G),	Gamma
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GST	Glutathion S-Transferase
GTH	Gemeinsame Tierhaltung
h	Stunde
HBSS	Hank`s balanced salt solution
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethanesulfonsäure
HLA-DR	Humanes Leukozytenantigen-DR
H₂O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
Hrsg.	Herausgeber
IC	Immunkomplex
i.d.	in der Regel
IFN-1	Interferon-1
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IgY	Immunglobulin Y
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
IL-1	Interleukin-1
IL-1α/β	Interleukin-1α/β
IL1-ra	Interleukin1-Rezeptorantagonist
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-21	Interleukin-21

Inc.	Incorporated
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
J-Kette	Joining Segment
κ	kappa
λ	lambda
kDa	Kilodalton
l	Liter
LIED	Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie
Ltd.	Limited
LTB4	Leukotrien B4
Ma	Marker
M	mol/Liter
μ (M)	my
m²	Quadratmeter
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
max.	Maximal
MBP	Maltose-Binde-Protein
mCol7^{vWFA2}	immunpathogenen Domäne von murinem Kollagen Typ VII
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol/Liter
mm	Millimeter
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
Mol	Ca.6,022x10 ²³ (Avogadro-Konstante) (Einheitenzeichen: mol)
MWCO	Molecular Weight Cut Off
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol/Liter
NaCl	Natriumchlorid
Na₂CO₃	Natriumcarbonat, wasserfrei
NADPH	Nikotinamid-Adenin- Dinukleotid Phosphat
ng	Nanogramm
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
Na₂HPO₄-2H₂O	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
Na₂HPO₄-H₂O	Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NC1	Nicht-kollagenöse Domäne 1
NC2	Nicht-kollagenöse Domäne 2
NC16a	Nicht-kollagenöse Domäne 16a
NKT	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NMS	Serum gesunder Mäuse
NaOH	Natronlauge
Na₃PO₄	Natriumphosphat
NR	Nicht-reduziert
OD	Optische Dichte
o.g.	Oben genannte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

%	Prozent
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween 20
PDE4	Phosphodiesterase 4
pH	pH-Wert
PMA	Phorbol 12-myristate-13-acetat
R	Reduziert
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid- Gelelektrophorese
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
T-bet	T-box-expressed-in-T cells
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris- HCl	Tris-Hydrochlorid
T-Zelle	T- Lymphozyt („T“ für Thymus)
T_H-Zelle	T-Helferzelle („T“ für Thymus)
$\gamma\delta$ T-Zelle	Gamma-delta T-Zelle („T“ für Thymus)
u.a.	Unter anderem
V	Volt
V_L	Variable Domäne der leichten Kette
V_H	Variable Domäne der schweren Kette
v.a.	Vor allem
UV	Ultraviolett
vWFA2	Von Willebrand-Faktor ähnliche Domäne A2
X	fach
z.B.	Zum Beispiel
z.T.	Zum Teil

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	10
1.1	Aufbau und Funktion der Haut.....	10
1.2	Bullöse Autoimmundermatosen.....	10
1.2.1	<i>IgM-abhängige AIBD</i>	11
1.3	Epidermolysis bullosa acquisita.....	12
1.3.1	<i>Pathomechanismus</i>	13
1.3.2	<i>Diagnostik</i>	14
1.3.3	<i>Therapie</i>	14
1.3.4	<i>IgM-EBA</i>	15
1.4	B- Zellen	16
1.5	Immunglobuline	18
1.6.	Ziel der Arbeit	21
2.	Materialien und Methoden	22
2.1.	Geräte.....	22
2.2.	Chemikalien	24
2.3.	Verbrauchsmaterialien.....	26
2.4.	Puffer und Lösungen	28
2.5.	Antikörper und Kits	29
2.6.	Software.....	30
2.7.	Mausseren.....	30
2.8.	Probenvorbereitung	31
2.9.	ELISA zur Quantifizierung der IgG-, IgM- und IgA-Konzentration	32
2.9.1.	<i>Konzentration im NMS</i>	32
2.10.	ELISA zum Nachweis Antigen-spezifischer IgG-, IgM- und IgA-Antikörper gegen mCol7 ^{vWFA2}	35
2.10.1.	<i>Kreuzreaktion von IgG, IgM und IgA mit den Sekundärantikörpern</i>	35
2.11.	Isolierung von IgM-Antikörpern mittels IgM-Säule	36
2.12.	Nachweis aufgereinigter IgM-Antikörper mittels Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-Page).....	37
2.13.	Isolierung von IgM-Antikörpern mittels IgM-Dialyse	38

2.14.	Isolierung von IgM-Antikörpern über eine Kombination aus IgG- und IgM-Säulen	39
2.14.1.	<i>HiTrap TM Protein G HP 1ml Säule</i>	39
2.14.2.	<i>Isolierung von IgM-Antikörper mittels kleiner und großer IgM-Säule</i>	39
2.15.	Indirekte Immunfluoreszenz.....	40
2.16.	ROS Release Assay	41
2.16.1.	<i>Isolierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten</i>	41
2.16.2.	<i>Durchführung des ROS Release Assay</i>	43
2.17.	Statistische Analyse.....	44
3.	Ergebnisse	45
3.1.	Bestimmung der Konzentration von IgG, IgM und IgA in NMS	45
3.2.	Ausschluss von Kreuzreaktionen der verwendeten ELISA Kits	46
3.3.	Bestimmung der Konzentration von IgG, IgM und IgA in NMS im ELISA nach Aufreinigung mittels IgM-Säule.....	47
3.4.	Gelelektrophorese nach IgM-Säule	48
3.5.	Bestimmung der Konzentration von IgG, IgM und IgA in NMS im ELISA nach Aufreinigung mittels Dialyse	50
3.6.	Bestimmung der Konzentration von IgG, IgM und IgA in NMS und EBA-Serum im ELISA nach Aufreinigung mittels kombinierter IgG-und IgM-Säule	51
3.6.1.	<i>Analyse der Immunglobulin Subklassen nach Aufreinigung von NMS</i>	51
3.6.2.	<i>Analyse der Subklassen nach Aufreinigung von EBA-Serum</i>	53
3.6.3.	<i>Analyse der Antigen-spezifischen Immunglobuline nach Aufreinigung von NMS und EBA-Serum</i>	54
3.7.	Nachweis der Antikörperbindung in gesunder Haut durch indirekte Immunfluoreszenz	55
3.8.	Stimulation von murinen Neutrophilen mit IC aus mCol7 ^{WFA2} und aufgereinigtem IgM führt nicht zu einer Freisetzung von ROS.....	57
4.	Diskussion.....	59
4.1.	Ausblick	70
5.	Zusammenfassung	71
6.	Literaturverzeichnis.....	72
7.	Anhänge	89
7.1.	Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren	89

8.	Eigenständigkeitserklärung.....	93
9.	Danksagung	94
10.	Lebenslauf.....	95

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Als eines der größten Organe des Menschen stellt die Haut eine Schutzbarriere gegenüber sämtlichen äußeren Einflüssen dar^{91,125}. Die Epidermis als ihre äußerste Schicht und die sich anschließende Dermis sind über eine Basalmembran verbunden. Diese dermo-epidermale Junctionszone (DEJ) besteht aus der Lamina lucida, Lamina densa und Sublamina densa¹¹⁶. Hier vorkommende Proteine und Strukturen verknüpfen mittels Hemidesmosomen die basalen Zellen der Epidermis mit den Ankerfibrillen der papillären Dermis und tragen zur Stabilität und Festigkeit der Haut bei²⁶. Das Zytoskelett des Stratum basale der Epidermis wird von Keratinfibrillen gebildet, welche über die Proteine Plektin und BP230 an Hemidesmosomen verankert sind. Außerdem verknüpfen diese Filamente ebenfalls Keratinozyten mittels Desmosomen untereinander. Über die Transmembranproteine BP180, $\alpha 6\beta 4$ Integrin und das Ankerfilament Laminin 332 der Hemidesmosomen sind die Keratinstrukturen mit den aus überwiegend Typ-VII-Kollagen bestehenden Verankerungsfibrillen in der Lamina densa und Sublamina densa verbunden^{36,152,198}. Die sich anschließende fettreiche Subkutis dient dem Körper u.a. zur Energiespeicherung und Wärmedämmung^{91,116}.

1.2 Bullöse Autoimmundermatosen

Bei den blasenbildenden Autoimmundermatosen handelt es sich um eine Gruppe heterogener Erkrankungsbilder von Haut und/oder Schleimhäuten¹⁶⁶. Sie sind gekennzeichnet durch Auto-Antikörper gegen desmosomale und hemidesmosomale Strukturproteine¹⁶⁰. Diese vermitteln die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionen in der Haut¹⁶⁶. Die Bindung der Autoantikörper gegen die entsprechenden Strukturproteine führt zu einer Spalt- oder Blasenbildung, oft begleitet von Komplementablagerungen und entzündlichen Reaktionen^{158,160}.

Die blasenbildenden Autoimmundermatosen können in drei Hauptgruppen eingeteilt werden: Pemphigus- und Pemphigoiderkrankungen sowie Dermatitis herpetiformis Dühring¹¹³.

Zu den Pemphiguserkrankungen zählen der Pemphigus vulgaris, der Pemphigus foliaceus, der IgA-Pemphigus sowie der paraneoplastische Pemphigus. Die

Gruppe der Pemphigoiderkrankungen beinhaltet das Bullöse Pemphigoid (BP), das Schleimhautpemphigoid, das Pemphigoid gestationis, die lineare IgA Dermatose, die Epidermolysis bullosa acquisita, den Lichen planus pemphigoides und das anti-p200 Pemphigoid¹⁶⁰.

Die Pemphiguserkrankungen gehen mit einer intraepidermalen Spaltbildung durch Autoantikörper gegen desmosomale Bestandteile der Haut (Desmoglein 1 und 3) einher¹⁶⁹, wohingegen Pemphigoiderkrankungen mit einer Spaltbildung zwischen Dermis und Epidermis durch Autoantikörper gegen hemidesmosomale Proteine (z.B. BP180 und Laminin 332) assoziiert sind¹⁶⁰. Bei den Pemphiguserkrankungen ist die Adhäsion der Keratinozyten untereinander gestört¹⁶⁹, während es bei den Pemphigoiderkrankungen zu typischen subepidermalen Blasenbildungen kommt^{22,160}.

Das Hauptantigen der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) ist das Typ-VII-Kollagen³⁵. Die Dermatitis herpetiformis führt ebenfalls zur subepidermalen Blasenbildung, jedoch sind die Antikörper beim Duhring gegen Gewebstransglutaminasen sowie epidermale Transglutaminasen gerichtet¹²³.

Die Inzidenz der bullösen Autoimmundermatosen (AIBD) ist sehr variabel. Bei den Pemphiguserkrankungen macht der Pemphigus vulgaris den größten Anteil der Erkrankungen aus⁶⁸. Unter den Pemphigoiderkrankungen stellt das BP die häufigste, das Schleimhautpemphigoid die zweithäufigste Autoimmundermatose dar^{15,46,87,90,108,121}. Eine verbesserte Diagnosefindung sowie eine zunehmend älter werdende Bevölkerung bewirken eine Zunahme der bullösen Autoimmundermatosen, v.a. ist die Zahl der BP-Erkrankungen in den letzten Jahren stark angestiegen^{14,108}. Allein in Deutschland verdoppelte sich die Inzidenz in den letzten 10 Jahren, aktuell mit ca. 2-30 Neuerkrankungen/1 Million Einwohner im Jahr^{157,159}.

1.2.1 IgM-abhängige AIBD

Neben den klassischen durch IgA- und IgG- induzierten Erkrankungen sind in der Literatur auch seltene Fälle von IgM- induzierten bullösen Autoimmundermatosen beschrieben, bei denen alle Patienten typische klinische Charakteristika der entsprechenden subepidermalen AIBD und eine lineare Ablagerungen von IgM und C3 an der DEJ zeigten: ein IgM-Schleimhautpemphigoid-Fall¹⁷³, Studien^{7,72,180,185}

und Fälle zum IgM (bullösen) Pemphigoid^{5,25,127} und ein kürzlich berichteter IgM-Pemphigoid-Fallbericht mit einem dem nicht-bullösen Pemphigoid ähnelnden Phänotyp¹⁷. Außerdem wurden Fälle einer alleinigen IgM-Ablagerung^{75,180} sowie mit linearer IgM-Ablagerung an der DEJ bei vorliegender Schwangerschaft mit heterogenem Phänotyp berichtet^{3,199}.

Für den Pemphigus vulgaris, welcher durch IgG-Antikörper gegen Desmoglein 3 (Dsg3) verursacht wird, ergaben die Untersuchungen der Rolle von IgM-Antikörpern gegen Dsg3 im Mausmodell keine Pathogenität¹⁷⁶.

Eine Studie über den endemisch (Liamo Verde) auftretenden brasilianischen Pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) zeigte eine IgM-Anti-Desmoglein1-Reaktion. Beide Pemphigus foliaceus-Formen teilen klinische, histologische und serologische (pathogene IgG-Autoantikörper gegen Desmoglein 1 (Dsg1)) Merkmale. Beim Fogo Selvagem zeigten sich jedoch deutliche IgM-Anti-Dsg1-Autoantikörperantworten im Serum von Probanden aus dem endemischen Gebiet - sowohl bei Fogo Selvagem-Patienten als auch bei gesunden Personen, die in Limao Verde und seinen benachbarten ländlichen Regionen leben -, was dadurch den entscheidenden Unterschied zum klassischen Pemphigus foliaceus sowie anderen bullösen Autoimmunerkrankungen ausmacht⁴⁸.

1.3 Epidermolysis bullosa acquisita

Die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) ist eine seltene chronische blasenbildende Autoimmunerkrankung der Haut und Schleimhaut. Ihre Inzidenz liegt bei 0,2 bis 0,5 Fällen pro Million und Jahr^{14,15} und sie tritt überwiegend zwischen dem 30. bis 60. Lebensjahr auf^{21,98}. Man unterscheidet eine häufigere nicht-inflammatorische Form mit Hautfragilität und blutgefüllten straffen Blasen von einer inflammatorischen EBA mit vesikulobullösen Eruptionen sowie Juckreiz^{27,66,85,98,160}. Weitere Varianten wie eine kongenitale EBA oder extrakutane Manifestationen sind möglich^{1,35,66,82,107,115}.

1895 wurde die EBA erstmals als hereditäre dystrophische Variante mit Manifestationsbeginn im Erwachsenenalter von Elliot beschrieben⁵⁴. 1971 wurde sie aufgrund ihrer klinischen sowie histologischen Merkmale durch Roegnik von

anderen blasenbildenden Erkrankungen abgegrenzt¹⁴⁹ und 1984 haben Woodley und Kollegen ein 290 kDa großes Protein an der Basalmembran der humanen Haut lokalisiert und als Ursache für die EBA ausfindig machen können¹⁹³. 1988 haben diese ebenfalls den Carboxyl-Terminus des Kollagen Typ VII (Col7) als Auto-Antigen identifiziert¹⁹⁴. Bei der EBA kommt meistens das Immunglobulin vom Typ IgG, selten auch um das vom Typ IgA vor^{27,98}. IgG bindet in der Regel Epitope innerhalb der NC1 Domäne des Col7^{34,59,109}, selten an NC2⁸⁵ oder die kollagene Domäne⁸⁴.

1.3.1 Pathomechanismus

Die Pathophysiologie der EBA ist umfangreich und komplex (Abb. 1)⁹³. Wie bei anderen blasenbildenden Autoimmundermatosen sind auch bei der EBA Antikörper gegen Antigene der Haut, in diesem Fall gegen das Col7, gerichtet¹⁶⁰.

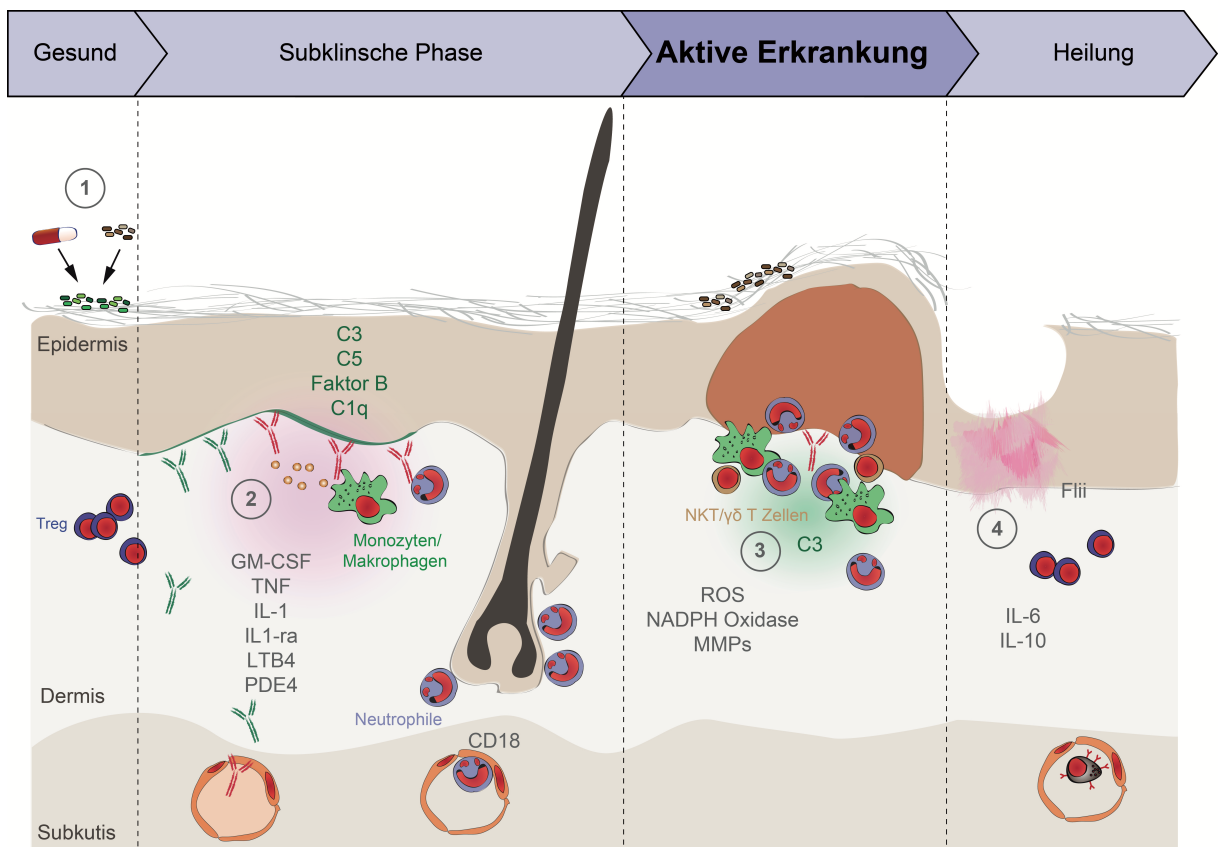


Abb.1: Pathogenese der EBA. (1) Mögliche Triggerfaktoren wie z.B. Medikamente, ein verändertes Mikrobiom, Entzündungen oder genetische Faktoren führen zum Verlust der Toleranz gegenüber Col7. Es kommt zur klonalen Expansion und Differenzierung von Plasmazellen, welche Auto-Antikörper gegen Col7 bilden. (2) Die Auto-Antikörper binden an Col7 in der DEJ der Haut. Es kommt zur Ablagerung von Komplementfaktoren, Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren wie IL-1 und GM-CSF sowie nachfolgender Extravasation von Leukozyten. (3) Immunkomplexe binden an Neutrophile und diese setzen u.a. MMPs und ROS frei. Neben Neutrophilen sind weitere Zellen wie z.B. Monozyten/Makrophagen, NKT- und γδ T-Zellen in die Spaltbildung involviert. Es kommt zur superepidermalen Blasenbildung und Entzündung der Haut. (4) Der Heilungsprozess wird bestimmt durch antiinflammatorische Zytokine wie IL-6 und IL-10 und die Aktivierung von Flii. Modifiziert nach¹⁰¹.

Folgende Abschnitte werden unterschieden⁹³: In der Induktionsphase (Verlust der Toleranz gegenüber Col7) spielen v.a. autoreaktive T-Zellen und Antigen-präsentierende B-Zellen eine bedeutende Rolle.

Genetische Faktoren wie z.B. ein Zusammenhang mit dem MHC Klasse II Haplotyp, vor allem HLA-DR2, sind ebenfalls mit der Entstehung der EBA assoziiert⁵⁸.

In der anschließenden Phase gehen aus den sich differenzierten B-Zellen sogenannte Auto-Antikörper produzierende Plasmazellen hervor⁶⁹.

Nach Bindung der Auto-Antikörper an Col7 entsteht ein proinflammatorisches Milieu. Dieses dient der Aktivierung des Komplementsystems, sodass aktivierte Spaltprodukte wie z.B. C5a neutrophile Zellen in die Haut locken^{93,147}. Diese werden durch Bindung an Immunkomplexe über Fcγ-Rezeptoren aktiviert⁹². Durch Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und von Proteasen kommt es zur direkten Schädigung der Haut an der DEJ. Hochregulierte Cytokine (z.B. GM-CSF, CXCL1/2 und IL-1α/β) verstärken die Neutrophilen-abhängige Entzündungsreaktion^{77,151,154,155}. Der anschließende Wundheilungsprozess wird durch die Phagozytose neutrophiler Granulozyten bestimmt¹⁶⁷ und ist abhängig von der Konzentration des Flightless-I-Proteins (Flii)¹⁰³.

1.3.2 Diagnostik

Die Diagnose EBA wird anhand mehrerer Parameter gestellt. Ein klinischer Verdacht wird durch weitere Untersuchungen wie den Nachweis einer linearen Bindung von IgG, IgA und Komplementfaktor C3 an der DEJ in einer periläsionalen Biopsie mittels direkter Immunfluoreszenz (DIF) untermauert^{27,115,160,174,175,183}. Alternativ können frei zirkulierende Anti-Col7-Antikörper mittels ELISA oder Immunoblot nachgewiesen werden^{33,35,102,115,153,160}. Zusätzliche Untersuchungen wie eine Histopathologie, Transmission- und Immun-Elektronen-Mikroskopie können bei unklaren Fällen hilfreich sein¹³⁵.

1.3.3 Therapie

Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung und somit geringen klinischen Datenlage wurden die bisherigen Therapieempfehlungen für die EBA nur aufgrund von Expertenmeinungen und anhand des Schweregrades der Erkrankung sowie dessen klinischen Phänotyps gestellt^{55,97}. In der aktuell angewandten Therapie der EBA stellen systemische Corticosteroide eine bedeutende Medikamentengruppe dar.

Vielversprechende therapeutische Maßnahmen können außerdem intravenöse Immunglobuline (IVIg)⁸³ sowie Rituximab, ein Anti-CD20-Antikörper, sein^{94,99,156}.

1.3.4 IgM-EBA

Die EBA zeichnet sich gewöhnlich durch Immunglobuline der Klasse IgG, die gegen Col7 gerichtet sind, aus³⁵. Es wurden auch schon bereits einige Fälle beschrieben, die durch den Typ IgA hervorgerufen worden sind. So zeigte sich u.a. eine subepidermale bullöse Dermatose mit ausschließlich linearen IgA-Ablagerungen entlang der epidermalen Basalmembran. In der indirekten Immunfluoreszenz zeigten sich zirkulierende IgA-Autoantikörper, die ausschließlich an die Hautstelle des salzgespaltenen Hautsubstrats gebunden waren. Klinisch entsprach die IgA-EBA einer klassischen linearen IgA-Dermatose vom Typ „Lamina-Lucida“ oder vom entzündlichen Typ der IgG-vermittelten EBA. Nur eine Minderheit der Patienten mit IgA-EBA zeigte Milien, Narben oder hatten therapieresistente Augensymptome wie beim mechanobullösen Typ von IgG-EBA. Die meisten Patienten mit IgA-EBA sprachen auf eine Dapson-Therapie an¹⁸².

2002 beschrieben Suchniak et al. erstmals einen Fall, bei dem nur Antikörper der Immunglobulinklasse IgM eine EBA verursachten. Der 64-jährige hellhäutige Patient zeigte über ein Jahr 3-5 mm große spontan oder durch geringfügige Traumata entstehende Hautblasen, welche unter Krustenbildung mit kleinen Narben verheilten.

Histologisch zeigte sich eine subepidermale Spaltbildung mit geringfügigem Entzündungsinfiltrat. In der direkten Immunfluoreszenz war eine kräftige lineare Bindung von IgM an der Basalmembran zu sehen und in der indirekten Immunfluoreszenz wurde eine IgM-Färbung ab einem Titer von 1:1280 sichtbar. Der Immunoblot wies eine starke IgM-Bindung an NC1 (aufgereinigte rekombinante NC1 Domäne von Col7) mit Iod 125-markiertem Anti-IgM auf¹⁷¹.

2015 berichteten Omland und Gniadecki von einem 74 Jahre alten Patienten mit einer EBA vom mechanobullösen Typ, die jedoch einen mildereren Phänotyp aufwies als der von Suchniak et al. beschriebene. Eine stoßweise auftretende epidermale Blasenbildung sowie Fragilität an den Fingern, Ellenbogen und dorsalem Handrücken sei seit 10 Jahren bekannt (Abb. 2).

Histologisch zeigten sich subepidermale Blasen und eine geringfügige

Vasodilatation mit wenig Lymphozyten. In der direkten Immunfluoreszenz waren lineare IgM- und C3-Ablagerungen (Abb. 2) und in der indirekten Immunfluoreszenz eine IgM-Bindung an der dermalen Seite der Spalt-Haut zu sehen. Unter Therapie (Prednisolon, Dapson, Mycophenolatmofetil) trat eine Remission auf. Der Krankheitsverlauf blieb stabil, gelegentlich entstanden Blasen an den Fingern und Füßen durch mechanische Traumata¹³⁹.

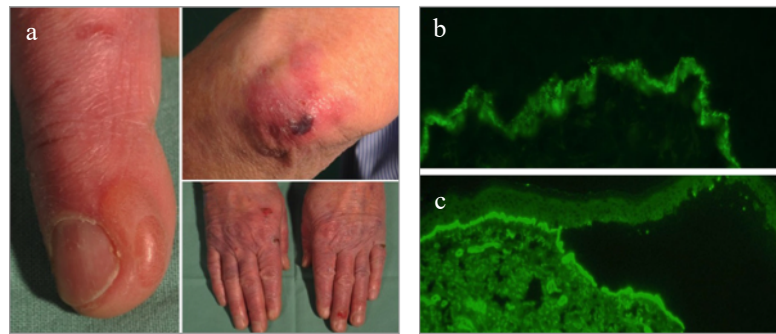


Abb. 2: klinisches Bild einer EBA und Direkte Immunfluoreszenz modifiziert nach¹³⁹. Gezeigt sind epidermale Blasen und Hautfragilität an Fingern, Ellenbogen und dorsalem Handrücken (a) sowie eine direkte Immunfluoreszenz (b) IgM und C3 an der Basalmembran der Haut und (c) Spaltbildung mit IgM-Bindung an der dermalen Hautseite. Die Vergrößerungsstufe betrug 9400.

Außerdem wurden in seltenen Fällen IgM-Gammopathien mit ähnlichen Blasenbildungen wie bei der EBA oder dem BP beschrieben. Diese weisen jedoch keine spezifischen Antigenziele auf^{32,44,61,119,126,189,190,195}. Möglicherweise handelt es sich hierbei um monoklonale IgM-Antikörper mit einer Kreuzreaktion zur Haut¹⁷¹.

1.4 B- Zellen

Im Rahmen der erworbenen, spezifischen Immunantwort entstehen Vorläufer-B-Lymphozyten im Knochenmark. Zunächst erfolgt eine Antigen-unabhängige, jedoch Stromazell-abhängige Immunglobulinumlagerung. Unreife B-Zellen besitzen funktionstüchtige IgM-Moleküle als Teil des B-Zell-Rezeptors (BCR) auf ihrer Oberfläche¹²⁹. Im Rahmen der zentralen Toleranz werden unreife B-Zellen auf Autoreaktivität geprüft und ggf. eliminiert oder inaktiviert: abhängig vom anzutreffenden Liganden können Apoptose/klonale Deletion, Rezeptor-Editing, Anergie oder immunologische „Ignoranz“ eintreten¹²⁹. Überlebende unreife B-Zellen reifen in der Peripherie heran. IgD- und IgM-exprimierende reife B-Zellen können in den sekundären lymphatischen Organen mittels spezifischem Fremdantigen aktiviert werden, sich vermehren oder zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen, die von T-Zellen aktiviert wurden, sowie langlebigen Gedächtniszellen, die im Rahmen der sekundären Immunantwort aktiv werden, differenzieren¹²⁹.

Durch somatische Hypermutationen werden B-Zellen autoreaktiv und ihre Affinität verstärkt¹²⁹. Ca. die Hälfte der BCRs besitzen möglicherweise aufgrund ihrer zufälligen Zusammensetzung einen sehr hohen Grad an Autoreaktivität¹⁶⁴.

Zentrale und periphere Mechanismen (Deletion, Rezeptor-Editing, Anergie) prägen das reaktionsfähige B-Zell-Repertoire und könnten Antworten auf selbstreaktive B-Zellen sein¹⁶⁴. Angeborene oder erworbene Defekte können zu einem Versagen dieser Mechanismen führen, sodass teilweise tolerierte oder nicht-tolerierten B-Zellen sowie ignorante Zellen mit latenter Autoreaktivität Vorläufer für aktivierte autoreaktive B-Zellen bei systemischer Autoimmunität sein könnten¹⁶⁴.

Die Aktivierung autoreaktiver B-Zellen scheint primär an extrafollikulären Stellen an der Grenze der T-Zone und in der roten Pulpa der Milz stattzufinden. Kurzlebige Plasmablasten erzeugen krankheitsbedingte Autoantikörper, die wahrscheinlich von T-Zellen beeinflusst und von TLRs gesteuert werden. Klonal ignorante B-Zellen sind T-Zell-unabhängig an der Entwicklung von Autoimmunreaktionen beteiligt, wohingegen anergische B-Zellen eher eine T-Zell-Hilfe benötigen¹⁶⁴.

Defekte der zentralen Toleranz (Toleranz-Modelle) sowie die Bedeutung einer vermutlich klassischen T-B-Wechselwirkung mit bidirektionaler Costimulation über T-Zell- oder DC-Wechselwirkungen sind bei Autoimmunerkrankungen (z.B. SLE) gut dokumentiert^{31,164}. Eine erhöhte Affinität für Selbstantigene, welche mit nominellen Selbstantigenen identisch sind oder dieselben Epitope wie diese enthalten (v.a. bei Anti-DNA)¹⁴⁶ könnten ursächlich sein. Körper eigene Autoantigene wie z.B. Chromatin beim SLE, sind im Überschuss und ubiquitär vorhanden. Diese werden von spezifischen Toll-like-Rezeptoren (TLR) erkannt, z.B. DNA von TLR9 und RNA von TLR7 und 8^{42,43,50,110,129,164,181}. Eine BCR-TLR-Costimulation führt zur Anti-Chromatin- oder Anti-RNA-B-Zelle mit Auto-Antikörper-Bildung sowie Antigen-präsentierender Zelle für autoreaktive T-Zellen¹²⁹. Durch eine positive Rückkopplung können eine chronische Entzündung mit nachfolgender Ausweitung der Autoreaktion auf neue Epitope des auslösenden Antigens sowie neue Autoantigene entstehen und die Autoantikörper-Vielfalt erhöht sich¹²⁹.

Weitere Ursachen für die Entstehung autoreaktiver B-Zellen könnten Entzündungen^{130,177}, bereits vorhandene Autoantikörper, die die Exposition von sich entwickelnden B-Zellen gegenüber Autoantigenen blockieren^{57,186} sowie eine Änderung der Form oder Verfügbarkeit des Autoantigens oder mögliche in großer Menge vorhandene, aber in nicht-immunogener Form vorliegende Auto-Antigene,

z.B. IgG nach Immun-Komplexbildung (sog. Rheumafaktor) sein¹²⁹. Weitere mögliche involvierte Faktoren und Zelltypen wie BAFF und APRIL¹⁶¹; IFN-1, das direkte und indirekte Auswirkungen auf B-Zellen hat^{45,111}; und DCs, die ICs einfangen und Zytokine einschließlich BAFF, APRIL und IFN-I sezernieren^{23,161}, werden vermutet.

Außerdem wurde von atypischen B-Zellen, die einen ähnlichen Phänotyp wie sogenannte altersassoziierte B-Zellen (ABCs) im Verlauf bestimmter Autoimmunerkrankungen hervorrufen, berichtet¹¹⁷. Diese atypischen B-Zellen, die T-bet exprimieren, und deren Akkumulation zu Verschiebungen in B-Zell-Untergruppen bei älteren Menschen führt, könnten für die Entstehung von Autoimmunität im Alter ursächlich sein¹¹⁷. Ähnlich wie bei der Entwicklung von ABCs mit zunehmendem Alter kann IL-21 auch die Erzeugung von T-bet und ABCs in Autoimmunmodellen vorantreiben¹²⁰. Außerdem spielen die TLR-Stimulation^{43,134} und die bevorzugte T_H17-Differenzierung bei der Autoantikörperproduktion und der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen eine Rolle¹⁸⁷ und es wurden neue Untergruppen von B-Zellen in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen (z.B. eine Population von Gedächtnis-B-Zellen mit der Krankheitsaktivität und den klinischen Manifestationen von Lupus bei SLE-Patienten) gefunden⁷⁰.

1.5 Immunglobuline

Immunglobuline werden von Plasmazellen gebildet⁸⁸ und kommen in gebundener Form an der Oberfläche von B-Zellen oder in freier Form im Blut vor¹⁴⁸. Sie setzen sich jeweils aus zwei identischen leichten (κ oder λ) und schweren Ketten (μ (M), δ (D), γ (G), α (A); ϵ (E)) zusammen²⁴. Die variablen (V_L) sowie konstanten (C_L) Domänen der leichten Ketten sind bei allen Immunglobulinklassen identisch¹⁴⁸, wohingegen die der schweren Ketten sich jeweils bei den einzelnen Antikörpern unterscheiden und somit deren jeweilige Klasse und Subklasse bestimmen^{24,88}. Die variablen Domänen der leichten und schweren Kette stellen Antikörper-spezifische Bindungsstellen (Epitop- bzw. Antigen-determinantenerkennung) für Antigene dar. In der konstanten Domäne ist das Fc-Teil enthalten, welches die Funktion des jeweiligen Antikörpers bestimmt¹⁴⁸.

Folgende fünf Immunglobulinklassen lassen sich beim Menschen unterscheiden (Abb.3)^{130,148}: Das Monomer IgG macht den Hauptanteil aller Immunglobuline im Serum aus und spielt eine Rolle im Rahmen der Sekundärantwort (Neutralisierung

von Antigenen, Phagozytose von Mikroorganismen, Aktivierung des Komplementsystems)^{24,148}. IgA befindet sich überwiegend als Dimer in Körperflüssigkeiten wie z.B. Tränenflüssigkeit und Speichel¹⁴⁸ und dient der Abwehr gegen Krankheitserreger, die vor allem über die Schleimhäute eindringen⁸⁸. IgE ist für die Abwehr von Parasiten sowie für die allergische Reaktion vom Soforttyp verantwortlich (Aktivierung der Ausschüttung von Mediatoren wie Histamin)¹⁴⁸. IgD kommt ebenfalls an der Oberfläche naiver B-Zellen vor¹⁴⁸.

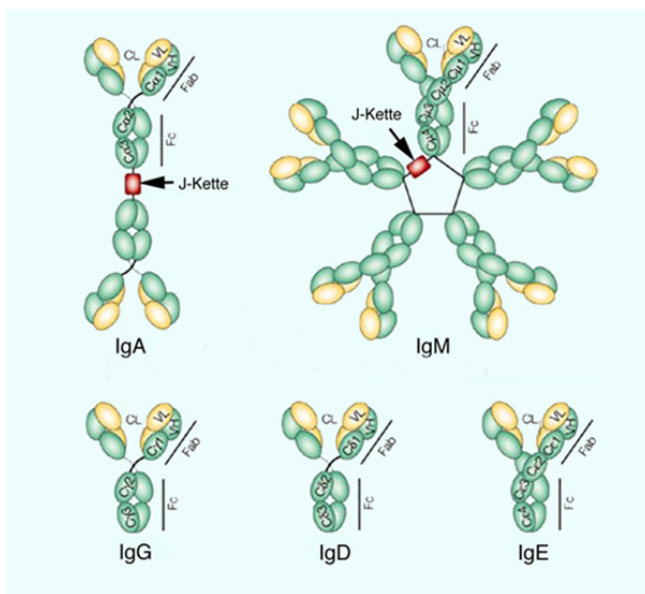


Abb. 3: Immunglobulinklassen modifiziert nach¹⁵⁰. Gezeigt sind die 5 unterschiedlichen Immunglobulinklassen (IgG, IgM, IgA, IgD und IgE). Die Immunglobulinklasse wird anhand des konstanten Teils der schweren Kette bestimmt. Es gibt 5 schwere Ketten: μ , δ , γ , α und ϵ . Diese sind aus einer variablen (V_H) und mehreren konstanten Domänen (C_H) aufgebaut. Gemeinsam mit den variablen Domänen der leichten Ketten stellen die schweren Ketten Bindungsstellen für Antigene dar. Sie sind für jeden Antikörper spezifisch. Die konstante Domäne enthält das Fc-Teil und bestimmt somit die Funktion des jeweiligen Antikörpers¹⁴⁸.

IgM wird als erster Antikörper während der Immunantwort produziert⁵² und spielt eine wichtige Rolle bei der Ersterkennung von Infektionserregern, einschließlich Bakterien und Viren^{11,18} und modifizierten Selbstantigenen^{30,137,184}. Es ist der vorherrschende Isotyp, der in T-Zell-unabhängigen Immunantworten sekretiert wird⁵². IgM kommt membrangebunden als Monomer auf naiven B-Zellen und sekretiert (als natürliches (angeborenes) oder adaptives (Antigen-induziertes), auch "immun" oder "induziertes" IgM) als monomeres, pentameres und hexameres IgM vor^{24,62,88,148,197}. Polymeres IgM kommt überwiegend bei gesunden Personen, monomeres jedoch häufig bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen vor⁶². IgM-Antikörper weisen eine geringere Affinität, jedoch eine höhere Polyreaktivität als IgG auf^{29,28}. Die polymere Struktur von sekretiertem IgM ermöglicht Wechselwirkungen mit hoher Avidität, die stärkere Bindungswechselwirkungen ermöglichen⁶⁵. Über mehrere Fab-Regionen kann IgM an multimere Antigene binden, während die Fc-Region den Komplement- und Opsonisierungsweg aktivieren kann⁴⁹. IgM spielt

auch eine Rolle bei der Entwicklung von Immunantworten gegen Krankheitserreger und Selbstantigene, indem es die Produktion von hochaffinem IgG beschleunigt^{19,53,52}. Bestimmte selbstreaktive IgM-Antikörper, sog. natürliche Antikörper, kommen bei Gesunden häufig vor und sind bereits bei der Geburt vorhanden^{41,73,78,122,124,165,178}. Sie werden von B-1-Zellen, die mindestens 80% des zirkulierenden IgM herstellen, produziert^{12,40} und haben möglicherweise immunregulatorische und schützende Eigenschaften bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen, entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunität. Im späteren Leben können Umweltfaktoren sowie erbliche Ursachen im autoreaktiven Repertoire natürlicher Antikörper vermutlich zur Veranlagung von Autoimmunität beitragen⁶⁴ und krankheitsbedingte regulatorische Veränderungen zur Änderung der Bindungsspezifität durch somatische Hypermutation und Klassenwechsel führen¹⁴³. Natürliches IgM reguliert die zentrale Toleranzinduktion von B-Zelle, möglicherweise durch Erleichterung der Autoantigenpräsentation, da natürliche IgM-sekretierende Zellen auf Selbstantigene selektiert und gegen diese gerichtet erscheinen^{13,74,133}. Neben üblichen mikrobiellen Antigenen scheinen sie auch auf Autoantigene^{9,52,179}, v.a. auf „veränderte“ Selbstantigene, wie die auf toten und sterbenden Zellen exprimiert werden, zu reagieren, was vermutlich die effiziente Entfernung von Gewebetrümmern und folglich potenzieller Autoantigene ermöglicht^{20,52,136,138,179}. Die Entwicklung von Autoantikörpern und das erhöhte Risiko für Autoimmunerkrankungen bei selektivem IgM-Mangel könnte somit wahrscheinlich auf eine Veränderung oder Unterbrechung der zentralen Toleranz von B-Zellen^{39,105,140,163} aufgrund einer ineffektiven Entfernung von Zelltrümmern in Abwesenheit natürlicher Antikörper zurückzuführen sein^{20,51,52,114,136}. Auch eine fehlende Unterdrückung der Produktion autoreaktiver IgGs durch bestimmte IgM-Autoantikörper mit unzureichender Autoantigen-Clearance^{20,51,52} kann zur Entwicklung von Autoantikörpern^{20,52,136,138,179} und Pathogenese systemischer Autoimmunität beitragen¹²⁸. Es sind sowohl Hyper-IgM- als auch Hypo-IgM-Zustände mit Autoimmunität beschrieben. Bei einer Vielzahl systemischer Autoimmunerkrankungen liegt eine polyklonale Gammopathie vor, z.T. kommen jedoch auch isoliert erhöhte IgM-Spiegel vor⁴⁹. Der seltene Zustand eines selektiven IgM-Mangels beim Menschen ist zwar mit wiederkehrenden Infektionen verbunden, jedoch durch ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wie Arthritis und systemischen Lupus erythematodes gekennzeichnet¹¹⁴.

1.6. Ziel der Arbeit

Bullöse Autoimmundermatosen (AIBDs) sind gekennzeichnet durch die Anwesenheit von Autoantikörpern gegen strukturelle Proteine der Haut. Diese bewirken nach der Bindung an ihr Zielantigen eine Zerstörung der Haut, Blasenbildung und die Aktivierung von Immunzellen. Diese Erkrankungen sind selten, aber die Therapie ist aufgrund einer allgemeinen Immunsuppression für die Patienten oft mit schweren Nebenwirkungen verbunden, die nicht selten die eigentliche Todesursache darstellen können. Die Diagnose aller AIBDs erfolgt über den Nachweis der spezifischen Antikörper in Serum und in der Haut. Normalerweise gehören die Antikörper bei allen AIBDs der IgG oder IgA Subklasse an. In neuerer Zeit wurden jedoch für verschiedene AIBDs auch Fallberichte mit Patienten veröffentlicht, die lediglich Antikörper gegen die IgM Subklasse aufwiesen. Diese betraf unter anderem die seltene Pemphigoiderkrankung Epidermolysis bullosa acquisita (EBA). Alle Fälle stellen einen milden Verlauf dar und es ist bisher nicht bekannt, ob es bei einem Fortschreiten der Erkrankung noch zu einer Verschiebung der Antikörpersubklassen kommen würde oder die Anwesenheit von IgM eventuell in frühen Krankheitsstadien bereits genügen kann, ein klinisches Bild hervorzurufen. Diese Beobachtung steht jedoch im Gegensatz zur postulierten Fähigkeit von IgM, Autoimmunkrankheiten zu unterdrücken.

An der Hautklinik in Lübeck wurde vor einigen Jahren ein Mausmodell entwickelt, bei dem durch Immunisierung mit der immunpathogenen Domäne von Kollagen VII (mCol7^{vWFA2}) die Bildung von Autoantikörpern und nachfolgend eine Erkrankung ähnlich dem klinischen Bild der EBA hervorgerufen wird.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es nun, zuerst den Anteil der Subklassen im Serum von gesunden und erkrankten Tieren zu bestimmen und anschließend eine Methode zur Isolierung von IgM-Antikörpern aus gepoolten Seren von Mäusen verschiedenen Alters und Geschlechts zu etablieren. Im Anschluss sollten Eluate und Durchfluss der Aufreinigung mittels allgemeinem und Antigen-spezifischem ELISA (Antikörper gegen das murine Kollagen-Typ-VII) geprüft werden und über eine indirekte Immunfluoreszenz eine mögliche Bindung der isolierten IgM-Antikörper an der DEJ überprüft werden. Ein möglicher Einfluss der IgM-Antikörper auf die Aktivierung von Neutrophilen, den Hauteffektorzellen der EBA, wurde mit Hilfe eines Assays zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies untersucht.

2. Materialien und Methoden

2.1. Geräte

Name	Firma, Firmensitz
Amersham Biosciences P-1, Peristaltic Pump "Pumpe P-1"	American Laboratory Trading, East Lime, USA
Cryostat Leica CM3050S	Leica Mikrosysteme Vertrieb, Wetzlar, Deutschland
CrystalCruz® Chromatography Columns, 2.5 cm x 20 cm	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Deltas, USA
Elektrophoresekammer Mini Protean II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
GIBCO BRL UV Transilluminator	Life Technologies, Carlsbad, USA
Fluoreszenz-/Lichtmikroskop BZ-9000	Keyence Deutschland, Neu-Isenburg, Deutschland
Gefrierschrank Ultra Low Temperature Freezer C660 Premium (-80°C)	New Brunswick Scientific Ltd., England, UK
Glomax, Discover	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
HiTrap TM Protein G HP, 1 ml Säule	GE Healthcare Bio sciences AR, Uppsala, Schweden
Kühlraum 4°C	Viessmann, Allendorf, Deutschland
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
LS Column	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnetrührer MR3002	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Mikrowelle	Siemens, Berlin/ München, Deutschland
MidiMACS Separator and MACS MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

Multipipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 30-300 µl	Eppendorf GmbH, Eppendorf, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland
Pasteur-Pipetten 1 ml	BioSigma, Cona, Italien
pH-Meter pH562	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten Research 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf GmbH, Eppendorf, Deutschland
Pipettierhilfe accu-jet	Brand, Hagen, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus reddot	Hirschmann, Neckartenzlingen, Deutschland
Spannungsquelle Electrophoresis Power Supply EPS 3500	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Schüttelinkubator CertomatIS	Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland
Schüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach, Deutschland
Sterile Werkbank Captair chem	Erlab, Düsseldorf, Deutschland
Sterile Werkbank Biowizard	Biowizard KOJAIR, Mänttä-Vilppula, Finnland
Testplattenmischer TPM 4	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Vakuumpumpe WISA	Steinkopf Laborausrüster, Lübeck, Deutschland
Victor3 Wallac 1420	PerkinElmer, Waltham, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Waage EMB 220-1	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
Waage Precision Standard	OHAUS, Parsippany, USA
Wilovert S Mikroskop	Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland

Zentrifuge Microstar 17R	VWR International, Radnor Pennsylvania, USA
Zentrifuge Centrifuge 5415 C	Eppendorf GmbH, Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5810 R	Eppendorf GmbH, Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5804 R	Eppendorf GmbH, Eppendorf, Deutschland

2.2. Chemikalien

Name	Firma, Firmensitz
Acrylamid 4K Solution (30%) Mix 49:1 (30% Acrylamide-bis (49:1))	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Fraktion V, biotinfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Aqua dest.	Hauseigene Herstellung
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DAPI (4',6-Diamidino-2- phenylindolhydrochlorid)	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat- Dihydrat (Na₂HPO₄-2H₂O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EDTA Dinatriumsalz-Lösung 0,1mol/l	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol ≥99,5 vergällt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Ethanol 70% vergällt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum, hitze inaktiviert (FCS)	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Glucose-(D+)-Lösung (100g/L in H₂O)	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethanesulfonsäure)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
HBSS (Hank`s balanced salt solution)	Thermo Fisher scientific, Waltham, USA
Luminol >= 97% (HPLC)	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Mowiol 4-88	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat, wasserfrei (Na₂CO₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat (Na₂HPO₄-H₂O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumphosphat (Na₃PO₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge 2 mol/l (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid Plättchen (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
PageBlue™ Protein Staining Solution	Thermo scientific, Waltham, USA

PMA (Stocklösung: 20 µg/ml) (Phorbol 12-myristate 13-acetate)	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
RPMI 1640 mit HEPES und L- Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland)
Salzsäure 2 mol (HCl)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Schwefelsäure 25% (H₂SO₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Slow-TMB-ELISA	Thermo scientific, Waltham, USA
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo scientific, Waltham, USA
Tris-Base	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland

2.3. Verbrauchsmaterialien

Name	Firma, Firmensitz
Biotech Grade Dialysis Membranes (CE), Spectra/Por®	Spectrum Laboratories, Inc. , Los Angeles, USA
Cell strainer, 70 µm, sterile	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Centricons Amicon-Ultra 15	Millipore, Bradford, USA
Centricons Amicon-Ultra 30	Millipore, Bradford, USA
Deckgläschen 24x60 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Eppendorf Combitips advanced® 0,5 ml, 2,5 ml, 5 ml, 10 ml, 12,5 ml	Eppendorf GmbH, Eppendorf, Deutschland
epT.I.P.S. ®Motion pipette tips 2-200 µl, 20-300 µl	Ependorf GmbH, Eppendorf, Deutschland

Immobilized Mannan binding Protein, 10 ml settled Gel	Thermo-Fisher scientific, Waltham, USA
Klebefolie, optisch, klar	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Microplatte, 96 Well, PS, F-Boden (Kaminform)), weiss, Lumitrac, High Binding, steril	Greiner Bio-One gmbH, Frickenhause, Deutschland
Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 well solid plate, flat bottom, MaxiSorp™	Thermo-Fisher scientific, Waltham, USA
Objektträger Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Parafilm Laboratory Film	Pechviex Plastic Packaging, Menasha, USA
PD-10-Desalting Columns 2,5 ml	GE Healthcare Bio sciences AR, Uppsala, Schweden
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
SafeSeal-Reagiergefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Sartorius™ Minisart NML Spritzenvorsatzfilter, 0,20 µm, steril	Thermo-Fisher scientific, Waltham, USA
Schraubröhrchen 15 ml, 120 x 17 mm	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Schraubröhrchen 50ml, 114 x 28 mm	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Selicone tube i.d. 1 mm	GE Healthcare Bio sciences AR, Uppsala, Schweden
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
STERICAN Ins. Einm. Kan. 26 Gx1/2 0,45x12 mm	B. Braun Melsingen AG, Melsingen, Deutschland
Omnifix-F, dreiteilige Einmal-Feindosierungsspritze mit Luer-Ansatz, 1 ml	B. Braun Melsingen AG, Melsingen, Deutschland
UV-Küvetten mikro 70 µl	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Whatmann TM Folded Filters Diameter 270 mm	GE Healthcare Bio sciences AR, Uppsala, Schweden

2.4. Puffer und Lösungen

Name	Bestandteile
10% APS	Aqua dest. mit 10% Ammoniumpersulfat
Carbonatpuffer	PBS-T mit 0,05 M Na ₂ CO ₃ , 0,05 M NaHCO ₃ bei pH=9,6
CL-Medium	RPMI 1640 ohne Phenolrot, mit L-Glucose, 25 mM HEPES, 2 g/L Glucose, 1% FCS
Dialysepuffer IgM-Dialyse	Aqua dest. mit 0,02M Tris, 1,25M NaCl bei pH=7,4
0,5 M EDTA pH 8,0	2,92 g EDTA plus 20 ml Aqua dest. mit NaOH Plätzchen auf pH=8,0 einstellen
ELISA Beschichtungspuffer	Aqua dest. mit je 0,05 mol/l Natriumcarbonat und Natriumhydrogencarbonat bei pH=9,6
ELISA Blockierungspuffer	Aqua dest. mit 50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% Albumin Fraktion V bei pH=8,0
ELISA Verdünnungslösung	Aqua dest. mit 50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% Albumin Fraktion V und 0,05% Tween20
ELISA Waschlösung	Aqua dest. mit 50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05% Tween20 bei pH=8,0
IgG-Säule Bindungspuffer	Aqua dest. mit 20 mM NaPO ₄ bei pH=7,0
IgG-Säule Elutionspuffer	Aqua dest. mit 0,1 M Glycin-HCL bei pH=2,8
IgM-Säule Bindungspuffer (IgM-Binding Buffer)	Aqua dest. mit 10 mM Tris, 1,25 M NaCl, 20 mM CaCl ₂ bei pH=7,4
IgM-Säule Elutionspuffer (IgM-Elution Buffer)	Aqua dest. mit 10 mM Tris, 1,25 M NaCl, 2 mM EDTA bei pH=7,4
IgM-Säule Vorbereitungs/ Umbettungspuffer (MBP Column Preparation Buffer)	Aqua dest. mit 20 mM Tris, 1,25 M NaCl bei pH=7,4
HBSS prep	HBSS mit 0,5% FCS, 20 mM HEPES

5xLaufpuffer	15 g Tris-Base, 72 g Glycin, 5 g SDS mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen
MACS-Puffer	PBS mit 0,5% BSA, 2 mM EDTA bei pH=7,2
NaCl-Lösung	Aqua dest. mit 1 M NaCl
PBS	Aqua dest. mit 0,154 M NaCl, 49 mM Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O, 6,5 mM NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O mit H ₃ PO ₄ auf pH=7,2 einstellen
PBS-T	PBS mit 0,05% Tween-20
ROS-Blocking-Puffer	PBS-T mit 1% BSA
5xSDS Ladepuffer	Aqua dest. mit 25 mL 1,5 M Tris pH 6,8, 12 g SDS, 60 mL Glycerol, 2 mL 0,2% Bromphenol Blau, 37,3 mL β-Mercaptoethanol
10% SDS	Aqua dest. mit 10% SDS
0,5 M Tris pH 6,8	Aqua dest. mit 0,5 M Tris-Base bei pH=6,8
1,5 M Tris pH8,8	Aqua dest. mit 1,5 M Tris-Base bei pH=8,8

2.5. Antikörper und Kits

Name	Bestandteile
Anti-mCol7^{vWFA2}-IgG (Stocklösung: 1mg/ml)	Hergestellt von Karsten Seeger und Claudia Kauderer im Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie (LIED) ^{16,112} , Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland
IgM-Purification Kit (Pierce™) (MBP Agarose Column, 5 ml, 1 column, IgM Binding Buffer, 800 ml, IgM Elution Buffer, 500 ml, MBP Column Preparation Buffer, 50 ml, Column Extender)	Thermo-Fisher scientific, Waltham, USA
mCol7^{vWFA2} (Stocklösung: 2 mg/ml)	Hergestellt von Karsten Seeger und Claudia Kauderer im Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie

	(LIED) ^{16,112} , Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland
Mouse IgA ELISA Quantitation Set	Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, USA
Mouse IgG ELISA Quantitation Set	Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, USA
Mouse IgM ELISA Quantitation Set	Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, USA
Neutrophil Isolation Kit, mouse (1 ml Neutrophil Biotin-Antibody Cocktail, 2 ml Anti-Biotin MicroBeats)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Unconjugated AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA
Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgM, μ chain specific	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA

2.6. Software

Name	Firma, Firmensitz
Graph-Pad-Prism V7	GraphPad Software, San Diego, USA
Mendely-Desktop	Elsevier B.V, Amsterdam, Niederlande
Microsoft Exel	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Power Point	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Word	Microsoft, Redmond, USA
SigmaPlot 13.0	Systat, Erkrath, Deutschland

2.7. Mausseren

Es wurden gepoolte Seren gesunder Mäuse verschiedenen Alters und Geschlechts sowie Seren von Mäusen 12 Wochen nach Immunisierung mit mCol7^{VWFA2}-Titermax, einem immunogenen Protein des murinen Typ-VII-Kollagens, verwendet. Die Seren wurden mir von Frau PD Dr. rer. physiol. Katja Bieber aus dem Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED) zur Verfügung gestellt. Im weiteren Verlauf

wird das Serum gesunder Mäuse als NMS und das Serum immunisierter (mCol7^{WFA2}-Titermax) Mäuse als EBA-Serum bezeichnet.

Die Seren entstammten aus Probenentnahmen zum AZ 5 (6-1/16) Bieber, 5 (98-7/15)_Bieber und 5_2017_09_05_Bieber. B6.SJL-H2^s C3^c/1CyJ Tiere (Jackson Laboratories, Ben Harbor, MA, USA, Stock 000966) wurden von Jackson Laboratories erworben und als eigene Zucht von der AG Ludwig in der GTH Lübeck gehalten. Es wurden Tiere beiderlei Geschlechts verwendet, die Tötung erfolgte durch qualifizierte Personen. Für die Fütterung der Tiere wurde Standardmausfutter verwendet, die Flüssigkeitsversorgung wurde mit angesäuertem Trinkwasser sichergestellt. Beides stand den Tieren jederzeit zur Verfügung. Die Mäuse wurden in einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Tötung der Tiere erfolgte unter Zuleitung von CO₂ und Genickbruch.

2.8. Probenvorbereitung

Das gepoolte Serum gesunder und kranker Mäuse wurde zunächst mittels *PD-10 Desalting Columns* für die IgM-Isolierung entsprechend dem „*Spin protocol*“ der Anleitung der *PD-10 Desalting Columns* umgepuffert. Dafür wurden *PD-10 Desalting Columns* benutzt. Jede wurde in ein 50 ml Schraubentröhrchen gestellt und mit *IgM-Binding Buffer* (Äquilibriumspuffer) beschichtet, welcher die Gelmatrix komplett durchlief. Dieser Schritt wurde viermal wiederholt und der Durchfluss verworfen. Bei der fünften Wiederholung wurde 2 min bei 1000xg zentrifugiert. Anschließend wurde das Mausserum auf die Säulen verteilt, diese in neuen 50 ml Schraubentröhrchen platziert und 2 min bei 1000xg zentrifugiert. Die Eluate wurden in einem 15 ml Schraubentröhrchen gepoolt und bei 4°C gelagert (Abb. 4).

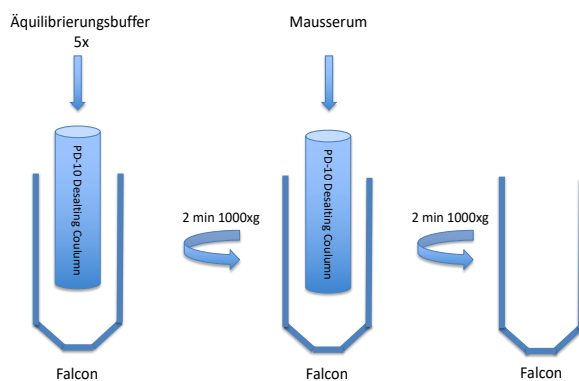


Abb. 4: Probenvorbereitung mittels PD-10 Desalting Columns.

Gezeigt wird die Probenvorbereitung. Entsprechend dem „*Spin protocol*“ der Anleitung der *PD-10 Desalting Columns* wurde gepooltes Serum gesunder sowie erkrankter Mäuse mittels *PD-10 Desalting Columns* für die IgM-Isolierung umgepuffert. Jede Säule wurde in zunächst mit *IgM-Binding Buffer* (Äquilibriumspuffer) fünfmal gewaschen und anschließend 2 min bei 1000xg zentrifugiert. Dann wurde das Mausserum auf die Säulen verteilt und diese 2 min bei 1000xg zentrifugiert. Die Eluate wurden gepoolt und bei 4°C gelagert.

2.9. ELISA zur Quantifizierung der IgG-, IgM- und IgA-Konzentration

2.9.1. Konzentration im NMS

Zur Ermittlung der Antikörperkonzentration im gepoolten NMS sowie der Überprüfung einer Kreuzreaktion der verwendeten Sekundärantikörper mit den Serumantikörpern wurde das *Mouse Elisa Quantitation Set* für die Antikörper IgG, IgM und IgA verwendet.

Für den ELISA wurde eine *96-Well-Platte* benutzt und alle Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

	IgG			IgA			IgM			Beschichtung IgM	Beschichtung IgA	Beschichtung IgG
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Standard 500 ng/ml	Standard 500 ng/ml	Sample 1:100	Standard 1000 ng/ml	Standard 1000 ng/ml	Sample 1:100	Standard 1000 ng/ml	Standard 1000 ng/ml	Sample 1:100	Sample 1:2500	Sample 1:2500	Sample 1:2500
B	Standard 250 ng/ml	Standard 250 ng/ml	Sample 1:100	Standard 500 ng/ml	Standard 500 ng/ml	Sample 1:100	Standard 500 ng/ml	Standard 500 ng/ml	Sample 1:100	Sample 1:2500	Sample 1:2500	Sample 1:2500
C	Standard 125 ng/ml	Standard 125 ng/ml	Sample 1:500	Standard 250 ng/ml	Standard 250 ng/ml	Sample 1:500	Standard 250 ng/ml	Standard 250 ng/ml	Sample 1:500	Sample 1:2500	Sample 1:2500	Sample 1:2500
D	Standard 62.5ng/ml	Standard 62.5ng/ml	Sample 1:500	Standard 125 ng/ml	Standard 125 ng/ml	Sample 1:500	Standard 125 ng/ml	Standard 125 ng/ml	Sample 1:500	Sample 1:2500	Sample 1:2500	Sample 1:2500
E	Standard 31 ng/ml	Standard 31 ng/ml	Sample 1:2500	Standard 62.5ng/ml	Standard 62.5ng/ml	Sample 1:2500	Standard 62.5ng/ml	Standard 62.5ng/ml	Sample 1:2500	Sample 1:100	Sample 1:100	Sample 1:100
F	Standard 15.6 ng/ml	Standard 15.6 ng/ml	Sample 1:2500	Standard 31 ng/ml	Standard 31 ng/ml	Sample 1:2500	Standard 31 ng/ml	Standard 31 ng/ml	Sample 1:2500	Sample 1:100	Sample 1:100	Sample 1:100
G	Standard 7.8 ng/ml	Standard 7.8 ng/ml	Sample 1:12.500	Standard 15.6 ng/ml	Standard 15.6 ng/ml	Sample 1:12.500	Standard 15.6 ng/ml	Standard 15.6 ng/ml	Sample 1:12.500	Sample 1:100	Sample 1:100	Sample 1:100
H	Blank	Blank	Sample 1:12.500	Blank	Blank	Sample 1:12.500	Blank	Blank	Sample 1:12.500	Sample 1:100	Sample 1:100	Sample 1:100

Abb. 5: Schema einer ELISA-Plattenbelegung. Gezeigt ist eine beispielhafte Belegung einer *96-Well-Platte*. Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt. In den Spalten 1-3 wurden die Konzentrationen von IgG, in 4-6 von IgA und in 7-9 von IgM überprüft. In Spalte 1 und 2 ist eine Standardverdünnungsreihe für IgG, in 4 und 5 für IgA und in 7 und 8 für IgM aufgetragen. In Spalte 3, 6 und 9 befand sich die Probe. In Zeile A und B lag diese in einer Verdünnung von 1:100, in C und D von 1:500, in E und F von 1:2500 und in G und H von 1:12500 vor. In Spalte 10-12 wurde die Kreuzreaktion von IgG-, IgM- und IgA-Antikörpern überprüft. Hierfür wurde die Platte mit IgG (Spalte 10), IgM (Spalte 11) und IgA (Spalte 12) beschichtet. Die Proben wurden in einer Verdünnung von 1:100 (Zeile E-H und 1:2500 Zeile A-D) als Doppelbestimmung verwendet. Als Sekundärantikörper wurden die beiden anderen HRP-gekoppelten Antikörper eingesetzt. Blau: HRP-gekoppelter Antikörper anti-IgA; grün: HRP-gekoppelter Antikörper anti-IgM; rot: HRP-gekoppelter Antikörper anti-IgG.

Zunächst wurden alle drei Beschichtungsantikörper 1:100 gleicherweise verdünnt. Dazu wurde 1 µl des entsprechenden Antikörpers in 100 µl ELISA Beschichtungspuffer pipettiert, 100 µl des verdünnten Antikörpers in jedes vorgesehene Well gegeben und die Platte für 60 min bei Raumtemperatur (RT) auf einem Schüttler inkubiert. Um einen Leerwert zu erhalten, lief die pure Verdünnungslösung für jede Standardverdünnungsreihe mit. Dann wurde die Platte

fünfmal gewaschen, indem die Wells mit 300 µl ELISA Waschlösung befüllt, ausgeschüttelt und ausgeklopft wurden. Anschließend wurde 200 µl ELISA Blockierungspuffer in jedes Well gegeben und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Platte wurde erneut wie oben beschrieben fünfmal mit der ELISA Waschlösung gewaschen und dann 100 µl des verdünnten Standards bzw. der verdünnten Probe in die entsprechenden Wells pipettiert (Abb. 5). Hierfür wurde für den Standard das Referenzserums mit der ELISA Verdünnungslösung gemäß der Herstelleranleitung verdünnt (Tab. 1) und folgende Standardverdünnungsreihen wie in Abb. 7 dargestellt erstellt.

Standard	IgG (ng/ml)	IgM (ng/ml)	IgA (ng/ml)
1	500	1000	1000
2	250	500	500
3	125	250	250
4	62,5	125	125
5	31,25	62,5	62,5
6	15,625	31,25	31,25
7	7,8	15,625	15,625
8	0	0	0

Tab. 1: Standardverdünnungsreihe mit bekannter Immunglobulinkonzentration der jeweiligen Referenzsera für IgG, IgM und IgA. Gezeigt ist eine Standardverdünnungsreihe mit bekannter Immunglobulinkonzentration der jeweiligen Referenzsera für IgG, IgM und IgA. Diese wurde bei allen ELISA-Durchläufen eingesetzt.

Die Proben wurden zunächst orientierend an den zu erwartenden Konzentrationen der zu untersuchenden Serumproben bzw. Antikörperaufreinigungen 1:100, 1:500, 1:2500 und 1:12.500 verdünnt, um geeignete Probenverdünnungen zu erhalten und unter Berücksichtigung, dass die Messwerte in den Bereich der Konzentration der jeweiligen Standards fallen (Tab. 1).

Die Platte wurde für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert und anschließend fünfmal mit der ELISA Waschlösung gewaschen, bevor 100 µl des entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers in das vorgesehene Well pipettiert und die Platte erneut für 60min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Der HRP-gekoppelten Antikörper wurde für IgG 1:10.000, IgM 1: 50.000 und IgA 1:20.000 verdünnt. Nach der Inkubation wurde die Platte fünfmal mit der ELISA Waschlösung wie oben beschrieben gewaschen, 100 µl TMB in jedes

Well gegeben, die Platte bei Raumtemperatur unter Sicht bis zur gewünschten Farbreaktion für die anschließende photometrische Messung inkubiert und die Farbreaktion durch Hinzufügen von 100 µl/Well 0,5 M H₂SO₄ beendet. Nach Abstoppen der Farbreaktion wurde die Absorption bei 450 nm mittels *ELISA plate reader VictorTM* bzw. *GloMax Discover Microplate Reader* gemessen.

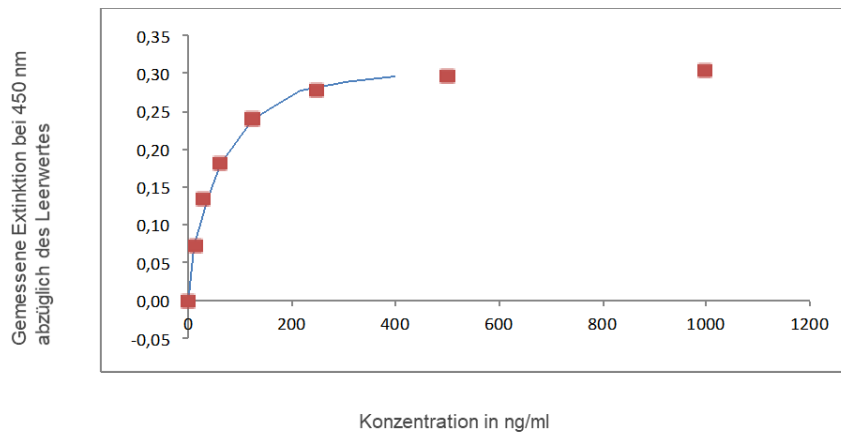


Abb. 6: Extinktionswerte einer Verdünnungsreihe eines IgM-Referenzserums bei 450 nm abzüglich des Leerwertes. Gezeigt sind die Extinktionswerte einer Verdünnungsreihe eines IgM-Referenzserums bei 450 nm abzüglich des Leerwertes. Eine Verbindung dieser Extinktionswerte ergibt einen sigmoidalen Verlauf mit einem Bereich linearer Steigung von ca. 0,05 - 0,25.

Anhand einer Standardkurve für jeden Antikörper konnte die Menge an Maus-IgG,-IgM und -IgA in der untersuchten Probe berechnet werden. Dafür wurden die gemessenen Absorptionswerte abzüglich des Leerwerts für jede Standardkonzentration gegen die entsprechende Maus-Antikörperkonzentration aufgetragen (Abb. 6). Die Werte wurden über eine sigmoidale Regression (Chapman, 3 Parameter) bestimmt. Um den genauesten Wert zu bestimmen, wurde der Mittelwert der verschiedenen Verdünnungsstufen ermittelt. Werte, die aufgrund einer zu hohen oder niedrigen Konzentration außerhalb der Regressionskurve lagen, wurden ausgeschlossen.

Um die Antikörperkonzentration in der unverdünnten Probe zu erhalten, wurde die berechnete Antikörperkonzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

Der beschriebene ELISA wurde im Verlauf ebenfalls zur Bestimmung der Reinheit und Konzentration der Antikörper IgG, IgM und IgA vor und nach den verschiedenen Aufreinigungsverfahren (IgM-Säule 2.11, IgM-Dialyse 2.13, kombinierte IgG- und IgM-Säule 2.14) im NMS und EBA-Serum verwendet. Es wurden das NMS und EBA-Serum sowie die gewonnenen und aufgereinigten IgG- und IgM-Euate, der

jeweilige Durchfluss, das Dialysat und der Überstand des NMS und EBA-Serums untersucht (Tab. 2).

	NMS	EBA-Serum	IgG-, IgM- und IgA-Verdünnung	Verwendet in Abschnitt
IgM-Säule	Pur Eluate Durchfluss	n.d.	1:1000 bis 1:125.000	2.11.
Dialyse	Pur n.d. Dialysat Überstand	n.d.	1:1000 bis 1:125.000	2.13.
kombinierter IgG- und IgM-Säule	Pur Eluate Durchfluss	Pur Eluate Durchfluss	1:1000 bis 1:125.000	2.14.
End-Konzentration nach IgG- und IgM-Säule	Pur Eluate Durchfluss	Pur Eluate Durchfluss	1:1000 bis 1:125.000	2.14.

Tab. 2: Schematische Darstellung der verwendeten Serumproben nach den verschiedenen Aufreinigungsverfahren für den nachfolgenden ELISA mit entsprechenden Antikörper-Verdünnungen. Gezeigt sind die verwendeten Materialien (gewonnene und aufgereinigte IgG- und IgM-Eluate, der jeweilige Durchfluss, Dialysat und Überstand sowie NMS und EBA-Serum), die zur Bestimmung der Reinheit und Konzentration der Antikörper IgG, IgM und IgA vor und nach den verschiedenen Aufreinigungsverfahren (IgM-Säule 2.11, IgM-Dialyse 2.13, kombinierte IgG- und IgM-Säule 2.14) im NMS und EBA-Serum mittels ELISA überprüft wurden.

2.10. ELISA zum Nachweis Antigen-spezifischer IgG-, IgM- und IgA-Antikörper gegen mCol7^{VWFA2}

Anhand eines Antigen-spezifischen ELISAs sollte untersucht werden, ob die Antikörper in den aufgereinigten IgG- bzw. IgM-Eluaten des NMS und EBA-Serums antigenspezifisch binden und in welchem Anteil die unterschiedliche Subklassen vorliegen. Die Durchführung erfolgte ebenfalls nach dem in Abschnitt 2.9.1 beschriebenen ELISA *Mouse Elisa Quantitaton Set* für die Antikörper IgG, IgM und IgA. Anstelle der mitgelieferten Beschichtungsantikörper wurde die Platte für die Eluate jedoch mit 100 µl laborintern hergestelltem mCol7^{VWFA2} beschichtet. Dieses wurde zuvor mit ELISA Beschichtungspuffer auf 2,5 µg/ml verdünnt. Die Proben (IgM-Eluate (NMS/EBA-Serum), IgG-Eluate (NMS/ EBA-Serum) wurden 1:50, 1:250, 1:1250 und 1:6250 verdünnt.

2.10.1. Kreuzreaktion von IgG, IgM und IgA mit den Sekundärantikörpern

Um die Kreuzreaktion der einzelnen Subklassen-spezifischen Antikörper (IgG, IgM und IgA) mit den Sekundärantikörpern zu überprüfen, wurden die entsprechenden Wells mit den jeweiligen Subklassen-spezifischen Antikörpern beschichtet und die

Probenverdünnungen 1:100 und 1:2500 verwendet (Abb. 5). Als Sekundärantikörper wurden die beiden anderen HRP-gekoppelten Antikörper des *Mouse Elisa Quantitation Sets* (z.B. HRP-IgG und -IgA bei Beschichtung mit Anti-IgM) benutzt. Der Versuchsablauf entsprach ansonsten dem unter 2.9.1. beschriebenen.

2.11. Isolierung von IgM-Antikörpern mittels IgM-Säule

Die IgM-Aufreinigung wurde entsprechend der Anleitung aus dem *IgM-Purification Kit* durchgeführt. Zunächst wurde die Säule mit 5 ml *MBP Column Preparation Buffer* bei Raumtemperatur und anschließend mit 20 ml gefiltertem *IgM-Binding Buffer* bei 4°C gewaschen. Dann wurde 4,5 ml gepooltes, in *MBP Column Preparation Buffer* umgepuffertes NMS sowie 1 ml *IgM-Binding Buffer* bei 4°C auf die Säule gegeben und drang in die Matrix ein. Danach wurde das Gel aufgeschwenkt und die Säule auf dem Rüttler bei 4°C 30 min aufrecht stehend inkubiert. Anschließend wurde die Säule bei 4°C mit 42 ml *IgM-Binding Buffer* gewaschen und der Durchfluss (ca. 80 ml) unter Messung bis zur *baseline* in 3 ml Portionen aufgefangen. Dann wurde 3 ml filtrierter *IgM-Elution Buffer* bei



Abb. 7: Isolierung von IgM-Antikörpern mittels IgM-Säule des IgM-Purification Kit. Entsprechend der Anleitung des *IgM-Purification Kits* wurde die IgM-Säule mit *MBP Column Preparation Buffer* und *IgM-Binding Buffer* bei 4°C gewaschen. Anschließend wurde ca. 4,5 ml umgebetetes und nicht steril gefiltertes NMS sowie 1 ml *IgM-Binding Buffer* bei 4°C auf die Säule gegeben. Die Säule inkubierte 30 min bei 4°C auf dem Rüttler, wurde dann mit 42 ml *IgM-Binding Buffer* gewaschen und anschließend mit *IgM-Elution Buffer* bei Raumtemperatur 1h inkubiert. Der Durchfluss (FT, ca. 80 ml) sowie das IgM-Eluat (ca. 10 ml) wurden auf ca. 1 ml mit PBS aufkonzentriert und bei -20°C bzw. bei 4°C in PBS gelagert.

Raumtemperatur auf die leere Säule pipettiert, welcher in das Gel eindrang und die Säule aufrecht stehend bei Raumtemperatur 1 h inkubiert.

Anschließend wurde das IgM-Eluat (ca. 10 ml) unter Messung am Photometer bis zu einem Wert von 0,02 in 2 ml Fraktionen gesammelt und anschließend gepoolt. Die Säule wurde gemäß der Anleitung mit 10 ml aq. dest. und 10 ml *IgM-Binding*

Buffer gewaschen und in 1,5 ml *IgM-Binding Buffer* bei 4°C aufrecht stehend gelagert.

Anschließend wurde das IgM-Eluat und der Durchfluss auf ca. 1 ml mit PBS mittels Centricon-Röhrchen aufkonzentriert und bei -20°C bzw. bei 4° in PBS gelagert (Abb.7).

2.12. Nachweis aufgereinigter IgM-Antikörper mittels Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Um die Reinheit des aufgereinigten NMS nach der IgM-Säule zu überprüfen, wurde im Anschluss eine Gel-Elektrophorese durchgeführt.

Zunächst wurden SDS-Gele, bestehend aus einem 6% Trenngel und einem 4% Sammelgel, hergestellt (Tab. 3). Hierfür wurde der Gel-Ansatz für das Trenngel in die vorgesehene Halterung pipettiert. Nach 20 min war dieses erhärtet. Der hergestellte Sammelgelansatz wurde anschließend luftblasenfrei auf das Trenngel aufgetragen. Ein Kamm zur Herstellung der Geltaschen wurde vorsichtig eingesetzt und die Probenansätze zusätzlich für 5 min auf 100°C denaturiert. Als Standard wurde 12 µl *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* verwendet. Für das NMS wurden 4 Teile Protein à 5 µg (13 µl) und ein Teil (3,25 µl) 5xSDS (Lämmli) zusammengefügt.

	Trenngel 6%	Sammelgel 4%
Aqua dest	2.65 ml	2,1 ml
1,5 M Tris pH 8,8	1,35 ml	-
0,5 M Tris pH 8,6	-	700 µl
30% Acrylamid-bis (49:1)	2,0 ml	650 µl
100% Glycerol	2,5 µl	1,25 ml
1 M Glycin	1,0 ml	-
0,5 M EDTA pH 8,0	-	40 µl
10% SDS	400 µl	200 µl
TEMED	12 µl	12 µl
10% APS	150 µl	100 µl

Tab. 3: Ansatz für Trenngel 6% und Sammelgel 4%. Gezeigt sind die Ansätze für das Trenngel 6% und das Sammelgel 4%, die für SDS-PAGE verwendet wurden.

Für das IgM-Eluat und den Durchfluss nach IgM-Säule wurden entsprechend 4 Teile Protein à 5 µg (18,6 µl) Protein und ein Teil (4 µl) 5xSDS (Lämmli) zusammen pipettiert. Der Standard sowie die Probenansätze wurden in die entsprechenden

Gel-Taschen T (T1 Ma (Marker), T2 NMS 25 µg, T3 /, T4 NMS 5 µg, T5 E1 (Eluat 1), T6 E6, (Eluat 6) T7 E40 (Eluat 40), T8 FT1 (Durchfluss 1), T9 FT13 (Durchfluss 13) und T10 FT40 (Durchfluss 40) pipettiert. Dann wurde die restliche Menge des 5xLaufpuffers eingefüllt. Die Elektrophorese erfolgte für 10 min bei 120 V und 1.20 h bei 160 V. Anschließend wurden die Gele dreimal für 1 min in frischem destilliertem Wasser in der Mikrowelle kurz erhitzt. Dann wurden die Gele in Page Blue über Nacht gefärbt und überschüssige Farbe am nächsten Tag mittels destillierten Wassers entfernt. Anschließend wurden die Gele digitalisiert.

2.13. Isolierung von IgM-Antikörpern mittels IgM-Dialyse

Alternativ zur Aufreinigung über die IgM-Säule erfolgte die Isolierung von IgM-Antikörpern aus NMS mittels Dialyse. Hierzu wurde der Dialyseschlauch *Biotech Grade Dialysis Membranes (CE)* mit einem Ausschlussvolumen von 120 kDa verwendet. Zunächst wurde der Dialyseschlauch bei Raumtemperatur 15 min in Wasser eingelegt und anschließend mit aq. dest. gespült.



Abb. 8: Isolierung von IgM-Antikörpern mittels Dialyse. Gezeigt ist die Isolierung von IgM-Antikörpern mittels Dialyse. Entsprechend der Anleitung des Dialyseschlauchs *Biotech Grade Dialysis Membranes Cellulose Ester (CE)* erfolgte eine IgM-Dialyse. Der vorbereitete Dialyseschlauch wurde mit 5 ml gepooltem Serum befüllt und inkubiert in Dialysepuffer (Verhältnis 10:1000) über Nacht bei 4C° auf einem magnetischen Rührer. Der Dialysepuffer wurde während des Dialysevorgangs nach 3h, 8h und 14h gewechselt. Das Dialysat wurde mit PBS aufkonzentriert und bei -20°C gelagert.

Dann wurde 5 ml gepooltes NMS in den Dialyseschlauch gegeben, dieser verschlossen und in Dialysepuffer (Verhältnis 10:1000) über Nacht bei 4C° auf einem magnetischen Rührer inkubiert. Der Dialysepuffer wurde während des Dialysevorgangs dreimal gewechselt: nach 3 h, 11 h und 14 h. Anschließend wurde das Dialysat aus dem Schlauch entnommen, aufkonzentriert, mit PBS umgepuffert und bei -20°C gelagert (Abb. 8).

2.14. Isolierung von IgM-Antikörpern über eine Kombination aus IgG- und IgM-Säulen

Um die Reinheit des isolierten IgM zu maximieren, erfolgte die Aufreinigung hier in 2 Schritten: (i) Abtrennung von IgG über eine *HiTrap TM Protein G HP, 1ml Säule* unter Gebrauch einer *Pumpe P-1* (ii) mittels kleiner (5 ml) und großer (20 ml) IgM-Säule.

2.14.1. HiTrap TM Protein G HP 1ml Säule

Für die IgG-Aufreinigung wurde die *HiTrap TM Protein G HP, 1 ml Säule* unter Gebrauch einer *Pumpe P-1* verwendet. Laut Anleitung wurde das gepoolte Mausserum mittels 0,2 µm Filter sterilfiltriert und mit gefiltertem *IgG-Binding Buffer* im Verhältnis 1:2 verdünnt. Anschließend wurde die Säule mit 15 ml *IgG-Binding Buffer* gewaschen. Dann wurde das Mausserum und die gleiche Menge an *IgG-Binding Buffer* über die Säule laufen gelassen. Beides wurde in einem 30 ml Schraubenröhrchen zusammen aufgefangen. Dann wurde die Säule bis zur *baseline* mit *IgG-Binding Buffer* gewaschen. Anschließend wurde unter Messung der Proteinkonzentration bei einer OD von 280 nm mit gefiltertem *IgG-Elution Buffer* eluiert und das aufgefangene IgG-Eluat im 15 ml Schraubenröhrchen mit 100 µl 1 M Tris-HCL pH 9,0 per ml IgG-Eluat versetzt. Anschließend wurde die Säule mit 10 ml *IgG-Elution Buffer* und 20%-igem Ethanol gewaschen und bei 4°C gelagert. Der Durchfluss und das IgG-Eluat wurden bei 4°C gelagert. Anschließend wurde das IgG-Eluat mit PBS und der Durchfluss mit *MBP Column Preparation Buffer* mittels Centricon-Röhrchen auf ca. 1 ml aufkonzentriert und bei -20°C bzw. bei 4°C in PBS gelagert (Abb. 9). Zur weiteren Aufreinigung über die IgM Säule wurde der Durchfluss der IgG Säule verwendet.

2.14.2. Isolierung von IgM-Antikörper mittels kleiner und großer IgM-Säule

Der Ablauf der IgM-Aufreinigung mittels IgM-Säule wurde bereits in Abschnitt 2.11 beschreiben. Zunächst wurde die kleine (5 ml) Säule des *IgM-Purification Kit* weiterhin verwendet.

Um größere Mengen an Material aufzureinigen zu können, wurde eine Säule mit 20 ml Säulenmaterial *Immobilized Mannan binding Protein, 10 ml settled Gel* befüllt. Zunächst wurde die Säule mit 80 ml gefiltertem *IgM-Binding Buffer* bei 4°C gewaschen. Dann wurden 2 ml aufkonzentrierter gefilterter IgG-Säulen-Durchfluss und 8 ml *IgM-Binding Buffer* je Durchlauf auf die Säule gegeben. Dieses drang in

die Matrix ein, das Gel wurde aufgeschwenkt und die Säule auf dem Rüttler bei 4°C 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Säule bei 4°C mit 180 ml *IgM-Binding Buffer* gewaschen und der Durchfluss unter Messung bis zur *baseline* aufgefangen. Dann wurde 12 ml filtrierter *IgM-Elution Buffer* bei Raumtemperatur auf die Säule pipettiert, welches in das Gel vordrang und die Säule aufrecht bei Raumtemperatur

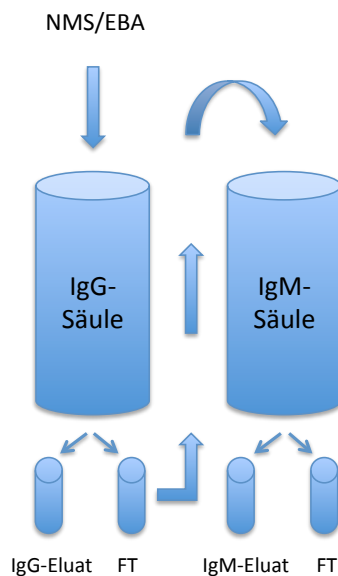


Abb. 9: Isolierung von IgM-Antikörpern mittels kombinierter IgG und IgM-Säule.

Gezeigt ist die Isolierung von IgM-Antikörpern mittels HiTrap TM Protein G HP 1ml Säule und IgM-Säule. Entsprechend der Anleitung der *HiTrap TM Protein G HP, 1 ml Säule* wurde für die IgG-Aufreinigung unter Gebrauch einer *Pumpe P-1* das gepoolte NMS/EBA-Serum filtriert und mit gefiltertem *IgG-Binding Buffer* im Verhältnis 1:2 verdünnt. Anschließend wurde die Säule mit 15 ml *IgG-Binding Buffer* gewaschen, das Mausserum und die gleiche Menge an *IgG-Binding Buffer* auf die Säule gegeben. Dann wurde die Säule mit *IgG-Elution Buffer* gewaschen und anschließend mit *IgG-Elution Buffer* eluiert. Das aufgefangene IgG-Eluat mit 100 µl 1 M Tris-HCL pH 9,0 per ml IgG-Eluat versetzt. Anschließend wurde das IgG-Eluat mit PBS und den Durchfluss mit *MBP Column Preparation Buffer* auf ca. 1 ml aufkonzentriert und bei -20°C bzw. bei 4° gelagert. Im Anschluss erfolgte die IgM-Aufreinigung zunächst gemäß dem *IgM-Purification Kit*. Entsprechend der Anleitung des *IgM-Purification Kits* wurde die IgM-Säule mit *MBP Column Preparation Buffer* (5 ml) und *IgM-Binding Buffer* (20 ml) bei 4°C gewaschen. Anschließend wurde ca. 4,5 ml umgebettetes und nicht steril gefiltertes NMS sowie 1 ml *IgM-Binding Buffer* bei 4°C auf die Säule gegeben. Die Säule inkubierte 30 min bei 4°C auf dem Rüttler, wurde dann mit 42 ml *IgM-Binding Buffer* gewaschen und anschließend mit *IgM-Elution Buffer* bei Raumtemperatur 1h inkubiert. Der Durchfluss sowie das IgM-Eluat wurden auf ca. 1 ml mit PBS aufkonzentriert und bei -20°C bzw. bei 4° in PBS gelagert. Im Verlauf wurde eine größere Säule (20 ml) mit Säulenmaterial (*Immobilized Mannan binding Protein, 10 ml settled Gel*) befüllt. Die IgM-Aufreinigung erfolgte entsprechend der Anleitung des *IgM-Purification Kits* bzw. des *Immobilized Mannan binding Protein, 10 ml settled Gel*. Die Säule wurde mit 80 ml *IgM-Binding Buffer* gewaschen. Ca. 2 ml aufkonzentrierter gefilterter IgG-Säulen-Durchfluss und 8 ml *IgM-Binding Buffer* wurden pro Aufreinigung verwendet und nach Inkubation mit 180 ml *IgM-Binding Buffer* gewaschen.

1h bzw. über Nacht inkubiert. Dann wurde das IgM-Eluat unter Messung am Photometer bis zu einem Wert von 0,02 in einem 50 ml Schraubenröhrchen gesammelt und ggf. gepoolt. Die Säule wurde mit 40 ml 20%-igem Ethanol gewaschen und darin aufrechtstehend bei 4°C gelagert. Anschließend wurden das IgM-Eluat und der Durchfluss getrennt mittels 15 ml und 30 ml Centricon-Röhrchen auf ca. 1 ml aufkonzentriert und in PBS bei -20°C bzw. *IgM-Binding Buffer* bei 4°C gelagert (Abb.9).

2.15. Indirekte Immunfluoreszenz

Um zu untersuchen, ob das gepoolte EBA-Serum sowie dessen aufgereinigte IgM- und IgG-Eluate eine Bindung an der Haut gesunder Mäuse eingehen, führte ich eine indirekte Immunfluoreszenz durch.

Dafür wurden das EBA-Serum sowie dessen aufgereinigte IgG- bzw. IgM-Eluate und als Sekundärantikörper FITC-gekoppelte Schaf Anti-Maus-Antikörper für IgM (*Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgM, µ chain specific*)

und FITC-gekoppelte Esel-Anti-Maus-Antikörper für IgG (*Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)*) verwendet. Zur Erstellung einer Verdünnungsreihe wurden das Serum sowie die Eluate mit PBS-T verdünnt (1:5, 1:25, 1:125). Dann wurde 50 µl je Verdünnung des EBA-Serums sowie dessen aufgereinigte IgG- bzw. IgM-Eluate auf einen Gefrierschnitt (4 µm) gesunder Maushaut gegeben. Als Negativkontrolle wurde PBS verwendet. Anschließend wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer für 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Gefrierschnitte dreimal 5 min in PBS gespült, mit 50 µl des 1:100 in PBS verdünnten IgG- bzw. IgM-Sekundärantikörpers auf die Gewebeschnitte beschichtet und erneut in einer feuchten Kammer für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Objektträger wieder dreimal 5 min in PBS gewaschen und mit 1:1000 in PBS verdünntem DAPI für eine 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese wurden dreimal 5 min in PBS-T gewaschen und unter Verwendung von Mowiol eingedeckelt. Die Gefrierschnitte wurden von Astrid Fischer angefertigt.

2.16. ROS Release Assay

2.16.1. Isolierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden mit Hilfe des *Neutrophil Isolation Kit mouse* aus dem Knochenmark gesunder Mäuse isoliert. Das Verfahren der Isolierung neutrophiler Zellen aus Mausknochen beruht auf immunomagnetischer Markierung von Leukozyten mit Ausnahme der neutrophilen Granulozyten. Die markierten Zellen werden magnetisch von den neutrophilen Granulozyten abgetrennt, sodass sich diese als einzige Fraktion der Leukozyten im Überstand befinden. Anschließend werden sie abpipettiert und weiterverarbeitet.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen an der Sterilwerkbank durchgeführt. Die Knochenentnahme erfolgte durch PD Dr. rer. physiol. Katja Bieber (Anzeige 5_2017-09-05_Bieber, 6 Mäuse).

i) Zellgewinnung aus dem Knochenmark

Für die Zellgewinnung aus dem Femur wurde zunächst ein 15 ml Schraubenröhrchen mit jeweils 2-4 ml HBSS prep befüllt. Anschließend wurde das Schraubenröhrchen auf Eis gestellt. Das Femur wurde aus der Maus entnommen

und in das vorbereitete Schraubenröhrchen überführt. Das Femur wurde präpariert und die Femurenden entfernt. Ein 50 ml Schraubenröhrchen wurde mit einem sterilen Sieb (70 µm) bestückt, das Knochenmark des Femurs mit ca. 2-5 ml HBSS prep aus dem Knochen mittels einer 20 ml Spritze mit einer Nadel (26G1/2) ausgespült und im vorbereiteten 50 ml Schraubenröhrchen aufgefangen. Mit einem Stampfer (Stopfer aus einer 1 ml Spritze) wurden im Sieb hinterbliebene Knochenmarksreste ausgedrückt und das Sieb anschließend mit HBSS prep gespült. Anschließend wurden die Zellklumpen mittels 25 ml Pipette resuspendiert und auf 20 ml mit HBSS prep aufgefüllt. Danach wurde bei 400xg für 5 min bei RT zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in MACS-Puffer resuspendiert und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellzahl wurde ermittelt, indem 10 µl der Zellsuspension mit 190 µl Trypanblau verdünnt wurden und die Anzahl der sich in zwei 4 x 4-Felder der Zählkammer befindenden Zellen unter dem Mikroskop bestimmt wurde. Das arithmetische Mittel wurde mit dem Kammerfaktor 10.000 und dem Verdünnungsfaktor 20 multipliziert, um die Zellzahl pro ml Suspension zu erhalten. Die Zellen wurden mit CL-Medium weiter verdünnt, bis die gewünschte Zelldichte von 2×10^6 Zellen pro ml erreicht war.

ii) Neutrophilen-Isolation mittels Neutrophil Isolation Kit mouse

Im ersten Schritt wurden die Zellen bei 300xg für 7 min bei RT zentrifugiert und der Überstand danach abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 200 µl MACS-Puffer je 5×10^7 Zellen resuspendiert. Anschließend wurden 50 µl *Neutrophil Biotin-Antibody Cocktail* je 5×10^7 Zellen hinzugefügt, gut gemischt und für 10 min im Kühlschrank inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 5-10 ml MACS-Puffer je 5×10^7 Zellen gewaschen, bei 300xg für 7min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 400 µl MACS-Puffer je 5×10^7 Zellen resuspendiert. Dann wurden 100 µl *Anti-Biotin MicroBeats* je 5×10^7 Zellen hinzugefügt, gut gemischt und für 15min im Kühlschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit 5-10 ml MACS-Puffer je 5×10^7 Zellen erneut gewaschen, bei 300xg für 7 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet zu 10^5 Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert (bei höherer Zellzahl wurde das Puffervolumen angepasst). Anschließend wurde die *LS column* in das magnetische Feld eines passenden *MidiMACS Separators and MACS MultiStands* gestellt. Die Säule wurde mit 3 ml MACS-Puffer gespült und äquilibriert, der Filter mit 500 µl MACS-Puffer durchgespült und äquilibriert (Der

MACS-Puffer wurde in einem 15 ml Schraubenvöhrchen aufgefangen). Die Zellsuspension wurde anschließend durch die Säule laufen gelassen und die Neutrophilen in einem 15 ml Schraubenvöhrchen aufgefangen. Im Anschluss wurde dreimal mit 3 ml MACS-Puffer gespült und der Durchfluss wurde ebenfalls mit zu den Neutrophilen gegeben.

Die mit Hilfe des *Neutrophil Isolation Kit mouse* isolierten Granulozyten wurden anschließend durch IC bestehend aus laborintern hergestelltem Antigen (mCol7^{vWFA2}) und Antikörper (laborintern hergestelltes anti-mCol7^{vWFA2}-IgG bzw. IgM-Eluat des EBA-Serums (anti-mCol7^{vWFA2}-IgM) aktiviert, um im ROS Release Assay die Aktivierbarkeit der isolierten neutrophilen Granulozyten zu prüfen.

2.16.2. Durchführung des ROS Release Assay

Für den ROS Release Assay wurde eine weiße 96-Well-Platte benutzt und alle Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt (Abb. 10).

Zunächst wurde 1 µg Antigen (laborintern hergestelltes mCol7^{vWFA2}) in 100µl Carbonatpuffer angesetzt, 100 µl Antigen-Carbonatpuffer-Lösung in die entsprechenden Wells und 100 µl Carbonatpuffer in die übrigen Wells gefüllt. Dann wurde die Platte für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Platte dreimal gewaschen, indem die Wells mit 300 µl PBS-T befüllt, ausgeschüttelt und ausgeklopft wurden. Anschließend wurde 200 µl ROS-Blocking-Puffer in jedes Well gegeben und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde erneut wie oben beschrieben dreimal mit PBS-T gewaschen und dann 100 µl des verdünnten Antikörpers der Konzentration 2 µg/ml ROS-Blocking-Buffer in die entsprechenden Wells und 100 µl des ROS-Blocking-Puffers in die entsprechenden Wells ohne Antikörper pipettiert. Als Antikörper wurden laborintern hergestelltes anti-mCol7^{vWFA2}-IgG bzw. das aufgereinigte IgM-Eluat des EBA-Serums (anti-mCol7^{vWFA2}-IgM) verwendet. Die Platte wurde anschließend für mindestens 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert und anschließend dreimal mit 300 µl PBS-T gewaschen, bevor 100 µl des CL-Mediums in alle Wells pipettiert und die Platte erneut auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Kurz vor der Zellzugabe wurde die Platte ausgeklopft und wieder mit 100 µl/Well CL-Medium befüllt. Wells, die für die Negativkontrollen nur Zellen, Antigen, Antikörper bzw. PMA (Endkonzentration von 0,1 µg/ml) und Zellen als Positivkontrolle enthalten sollen, wurden mit der Zellsuspension entsprechenden

Menge an ROS-Blocking-Buffer beschichtet. Anschließend wurden 10 µl Luminol (ca. 2,2 mg Luminol in 1,1 ml ddH₂O, dafür 2,2 mg Luminol in 8,8 µl NaOH lösen und mit 1,1 ml ddH₂O je 2,2 mg Luminol verdünnen) angesetzt, welches bei im Rahmen der vierstündigen Messung vom *ELISA plate reader* bzw. *GloMax Discover Microplate Reader* hinzugefügt wird. Dann wurden die Zellen in CL-Medium auf eine Konzentration von 2,5x 10⁶ Zellen/ml eingestellt und 100 µl Zellsuspension je Well hinzugefügt. Durch die Bindung der Zellen an die ICs wurden die Zellen aktiviert und setzten ROS frei. Die Messung bei 37°C detektiert die vom oxidierten Luminol emittierten Photonen im blauen Bereich des Lichtspektrums. Die mehrstündige Messung ergibt je einen Absorptionswert pro Sekunde für mehrere Wiederholungen.

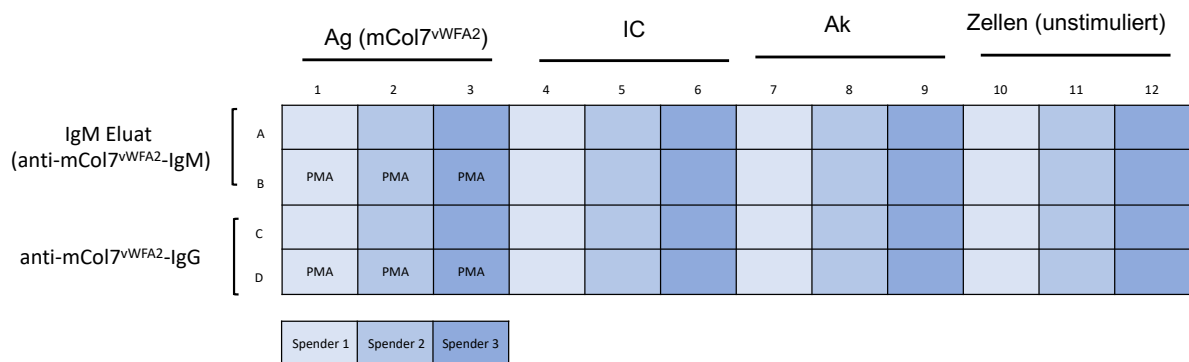


Abb. 10: Schema der ROS Release Assay-Plattenbelegung. Gezeigt ist die Belegung einer 96-Well-Platte. Die Spalten 1-3 wurden mit Ag (laborintern hergestelltes mCol7^{vWFA2}), die Spalten 4-6 mit IC (Antigen (laborintern hergestelltes mCol7^{vWFA2}) und Antikörper (laborintern hergestelltes anti-mCol7^{vWFA2}-IgG bzw. IgM-Eluat des EBA-Serums (anti-mCol7^{vWFA2}-IgM)), die Spalten 7-9 mit Ak (Laborintern hergestelltes anti-mCol7^{vWFA2}-IgG bzw. IgM-Eluat des EBA-Serums (anti-mCol7^{vWFA2}-IgM) und die Spalten 10-12 mit Zellen (neutrophile Granulozyten unstimuliert) beschichtet. In Zeile A und B wurde das IgM-Eluat (anti-mCol7^{vWFA2}-IgM) und in Zeile C und D das Laborintern hergestellte anti-mCol7^{vWFA2}-IgG als Antikörper verwendet. Spender 1 (hellblau), Spender 2 (mittelblau) und Spender 3 (dunkelblau) sind die drei verwendeten Mäuse, aus denen die neutrophilen Granulozyten gewonnen wurden. Als Positivkontrolle diente PMA (B1-3 und D1-3)). Die Zellen (neutrophile Granulozyten) wurden auf einer Verdünnung von 2,5x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Ag: Antigen; Ak: Antikörper; IC: Immunkomplex, n= 2x mit je 3 Spendern durchgeführt.

Davon ausgehend wird das Integral aus der Fläche unter Kurve der detektierten Menge der ROS bestimmt, um den Verlauf der ROS-Freisetzung während der Messung quantifizieren zu können. Zur Analyse wurde die Fläche unter der Kurve der jeweiligen Verläufe der Lumineszenz über die Zeit bestimmt.

2.17. Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte anhand von Kruskal-Wallis-Tests mit Bonferoni-Post-Test, welche für Mehrfachvergleiche von nicht normalverteilten Daten verwendet werden. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle Daten wurden mittels Graph-Pad Prism V7 analysiert und als Tukey Box-und Whisker Blot dargestellt.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur Isolation von IgM aus Mausserum zu etablieren. Unseres Wissens gibt es bislang bis auf eine Veröffentlichung¹⁴² keine weiteren, die diese Methode beschreibt. Mit Hilfe von entsprechenden Säulen ist bisher nur die Isolation aus Aszitisüberstand beschrieben^{4,86,100,141}. Daher wurden zunächst gepoolte Seren gesunder Mäuse verwendet und 3 Methoden verglichen: (i) direkte Aufreinigung über eine kommerziell erwerbliche IgM Säule, (ii) Isolation über Dialyse und (iii) Abtrennung von IgG aus dem Serum und anschließend eine Aufreinigung über eine kommerziell erwerbliche IgM Säule. Die wirksamste Methode wurde dann zur Aufreinigung von IgM aus Serum von Mäusen mit experimenteller EBA verwendet. Eine potenzielle Pathogenität von IgM bei EBA wurde in vitro überprüft.

3.1. Bestimmung der Konzentration von IgG, IgM und IgA in NMS

In einem ersten Schritt musste die Konzentration von IgG, IgM und IgA in NMS kontrolliert werden, um die Beladungsmenge für die IgM Säule festzulegen. Normwerte hierfür liegen bei 2000-5000 µg/ml für IgG, 800-6500 µg/ml für IgM und 1000-3200 µg/ml für IgA (Tab. 4)⁷⁹. Aus diesem Grund wurde zunächst die Antikörperkonzentration im gepoolten NMS für die Subklassen IgG, IgM und IgA bestimmt.

	IgG (µg/ml)	IgM (µg/ml)	IgA (µg/ml)
NMS	2000-5000	800-6500	1000-3200

Tab. 4: Immunglobulinkonzentration in normalen Serum von Mäusen modifiziert nach⁷⁹. Gezeigt sind die Immunglobulinkonzentrationen von IgG, IgM und IgA in NMS.

Anhand einer Standardkurve für jeden Antikörper konnte die Menge an Maus-IgG, -IgM und -IgA in der untersuchten Probe berechnet werden (Abb. 11). Dafür wurden die gemessenen Absorptionswerte abzüglich des Leerwerts für jede Standardkonzentration gegen die entsprechende Maus-Antikörperkonzentration aufgetragen. Die Werte wurden über eine sigmoidale Regression (Chapman, 3 Parameter) bestimmt. Um den genauesten Wert zu bestimmen, wurde der Mittelwert der verschiedenen Verdünnungsstufen ermittelt. Werte, die aufgrund einer zu hohen oder niedrigen Konzentration außerhalb der Regressionskurve

lagen, wurden ausgeschlossen. Um die Antikörperkonzentration in der unverdünnten Probe zu erhalten, wurde die berechnete Antikörperkonzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

Die Konzentrationen der jeweiligen Antikörper IgG, IgM und IgA, welche mittels ELISA bestimmt wurden (Tab. 5), entsprachen weitestgehend den in der Literatur vorliegenden Grenzwerten für IgG, IgM und IgA im NMS (2000-5000 µg/ml für IgG, 800-6500 µg/ml für IgM und 1000-3200 µg/ml für IgA) (Tab. 4)⁷⁹. Die Messungen in 5 verschiedenen Pools ergaben Werte von 1773,9-6055,0 µg/ml für IgG, 439,0-2083,9 µg/ml für IgM und 892,5-7642,0 µg/ml für IgA (Tab.5).

Probe	IgG (mg/ml)	IgM (mg/ml)	IgA (mg/ml)	Verwendet in Abschnitt
NMS Pool 1	6055,0 µg/ml	1210,0 µg/ml	7642,0 µg/ml	3.1.
NMS Pool 2	3861,0 µg/ml	439,0 µg/ml	2956,0 µg/ml	3.3.
NMS Pool 3	2285,8 µg/ml	2083,9 µg/ml	2808,7 µg/ml	3.5.
NMS Pool 4	2308,2 µg/ml	521,0 µg/ml	3021,8 µg/ml	3.6.1
NMS Pool 5	1773,9 µg/ml	456,9 µg/ml	892,5 µg/ml	3.6.1

Tab. 5: Konzentration von IgG, IgM und IgA in NMS-Serum mittels ELISA. Gezeigt sind Immunglobulinkonzentrationen von IgG, IgM und IgA im NMS nach Messungen mittels ELISA. Im Verlauf dieser Doktorarbeit wurden 5 verschiedenen NMS Pools verwendet.

3.2. Ausschluss von Kreuzreaktionen der verwendeten ELISA Kits

Eine Kreuzreaktionen der einzelnen Antikörper der ELISA Kits mit den anderen untersuchten Subklassen (IgG, IgM und IgA) würde das Ergebnis der Konzentrationsbestimmung in allen folgenden Untersuchungen verfälschen. Da das Ziel dieser Arbeit jedoch eine Isolation von IgM (unter entsprechender Abtrennung von IgG und IgA) ist, muss unterschieden werden, ob das Vorhandensein anderer Subklassen auf eine Kreuzreaktion des IgM ELISA Kits mit anderen Subklassen oder eine Verunreinigung zurück zu führen ist.

Zur Überprüfung der Kreuzreaktion der einzelnen ELISA Kits mit den anderen untersuchten Subklassen (IgG, IgM und IgA) wurde ein ELISA wie in Abschnitt 2.9 und 2.10. beschrieben durchgeführt.

Bei einer Serumverdünnung von 1:2500 ergab sich bei einer Beschichtung mit IgG eine 2,4%-ige Kreuzreaktion mit IgM (0,012 mg/ml) und eine 0,6%-ige mit IgA (0,033 mg/ml), bei einer Beschichtung mit IgA waren es eine 0,71%-ige Kreuzreaktion mit IgG (0,067 mg/ml) und eine 9,8%-ige mit IgM (0,049 mg/ml) und bei einer Beschichtung mit IgM ergaben sich eine 0,86%-ige Kreuzreaktion mit IgG (0,082

mg/ml) und eine 4,29%-ige mit IgA (0,236 mg/ml). Die im Kit mitgelieferte Serumprobe diente als Referenz (Tab. 6).

mg/ml	Serumverdünnung	IgG	IgM	IgA
<i>IgG-Beschichtung 1:100</i>	1:2500	9,5*	0,012 (2,4%)	0,033 (0,6%)
<i>IgM-Beschichtung 1:100</i>	1:2500	0,082 (0,86%)	0,5*	0,236 (4,29%)
<i>IgA-Beschichtung 1:100</i>	1:2500	0,067 (0,71%)	0,049 (9,8%)	5,5*

Tab. 6: Kreuzreaktion der einzelnen Antikörper IgG, IgM und IgA im NMS mit den Sekundärantikörpern mittels ELISA. Gezeigt sind die Kreuzreaktionen der einzelnen Antikörper IgG, IgM und IgA des NMS mit den Sekundärantikörpern des *Mouse Elisa Quantitation Sets*. Für diesen ELISA wurde die Mikrotiterplatte mit den jeweiligen Affinitätsantikörpern gegen IgG, IgM oder IgA beschichtet. Die im Kit mitgelieferte Serumprobe diente als Referenz. Als Sekundärantikörper dienten die beiden anderen HRP-gekoppelten Antikörper. *Serumkonzentration der jeweiligen Antikörper (bestimmt durch Fa. Bethyl nach Angaben im ELISA Kit).

3.3. Bestimmung der Konzentration von IgG, IgM und IgA in NMS im ELISA nach Aufreinigung mittels IgM-Säule

Zur Isolierung der IgM-Antikörper aus NMS wurde im ersten Versuch zunächst lediglich eine käuflich erwerbliche IgM Säule verwendet. Die IgM-Aufreinigung wurde entsprechend der Anleitung aus dem *IgM-Purification Kit* durchgeführt.

Es zeigte sich, dass der prozentuale Anteil von IgM am Gesamtimmunglobulin im NMS ca. 6% (3292,5 µg/ml) beträgt. Nach der Aufreinigung mittels IgM-Säule betrug der prozentuale Anteil von IgM im aufgereinigten IgM-Eluat ca. 27% der Gesamtmenge des IgM im NMS (892,1 µg/ml: Eluate-Mix (E1-E6) (133,6 µg/ml) und IgM-Eluate-Mix (E7-E40) (758,5 µg/ml)). Es wird somit deutlich, dass ein großer Teil an IgM im aufgereinigten IgM-Eluat vorhanden ist. Es zeigt sich, dass sich der größte Anteil von IgG und IgA wie gewünscht im Durchfluss befindet, somit aus dem IgM-Eluat entfernt werden konnte.

Dies zeigt einerseits den Erfolg der Methode, jedoch war im Vergleich zu IgM (892,1 µg/ml) auch noch sehr viel IgG (648,7 µg/ml) und IgA (385,6 µg/ml) im aufgereinigten IgM-Eluat (Eluate-Mix (E1-E6) und IgM-Eluate-Mix (E7-E40)) vorhanden: prozentuales Verhältnis 46,3 IgM%, 33,7% IgG und 20,0% IgA. Das Problem bestand somit folglich darin, dass wenn man den Effekt von IgM untersuchen will, ein reineres aufgereinigtes IgM-Eluat notwendig ist. Da diese

Methode den gewünschten Effekt nicht erbringt, mussten somit weitere Methoden ausprobiert werden (Tab. 7).

	Volumen (ml)	IgG (µg/ml)	Gesamtmenge IgG (µg)	IgM (µg/ml)	Gesamtmenge IgM (µg)	IgA (µg/ml)	Gesamtmenge IgA (µg)
NMS Pool 2 (vor Säule)	7,5	3861,0	28957,5 (53,2%)	439,0	3292,5 (6,1%)	2956,0	22170,0 (40,7%)
Eluate-Mix (E1-E6)	1,3	127,0	164,0 (43,6%)	102,8	133,6 (35,5%)	60,4	78,5 (20,9%)
Eluate-Mix (E7-E40)	3,7	131,0	484,7 (31,3%)	205,0	758,5 (48,9%)	83,0	307,1 (19,8%)
E3	2,0	11,4	22,8 (21,0%)	36,3	72,6 (67,0%)	6,5	13,0 (12,0%)
E6	2,0	2,9	5,8 (18,7%)	10,8	21,6 (69,7%)	1,8	3,6 (11,6%)
E40	2,0	0	0 (0,0%)	0	0 (0,0%)	2,4	4,8 (100%)
FT1	2,0	3798,6	7597,2 (82,3%)	71,6	143,2 (1,6%)	744,4	1488,8 (16,1%)
FT13	2,0	55,6	111,2 (74,0%)	7,7	15,4 (10,3%)	11,8	23,6 (15,7%)
FT40	2,0	0	0 (0,0%)	0	0 (0,0%)	6,4	12,8 (100%)

Tab. 7: Konzentration von IgG, IgM und IgA im NMS, in den IgM-Eluaten Eluate-Mix (E1-E6), Eluate-Mix (E7-E40), E3, E6 und E40 sowie im Durchfluss FT1, FT13 und FT40 in NMS mittels ELISA nach Aufreinigung mittels IgM-Säule. Gezeigt sind die Konzentrationen der jeweiligen Antikörper IgG, IgM und IgA in den IgM-Eluaten Eluate-Mix (E1-E6), Eluate-Mix (E7-E40), E3, E6 und E40 sowie im Durchfluss FT1, FT13 und FT40 des normalen Mausserums nach Aufreinigung mittels IgM-Säule. Es sind jeweils die vorhandenen Volumina in ml, die Konzentrationen der Antikörper in µg/ml sowie die Gesamtkonzentration der Antikörper je vorhandenem Volumen und der prozentuale Anteil angegeben.

3.4. Gelelektrophorese nach IgM-Säule

Zur Kontrolle der Reinheit des aufgereinigten IgM-Eluats aus NMS wurde nach der Isolation über die IgM-Säule zusätzlich noch eine Gelelektrophorese durchgeführt. Diese erfolgte in einem reduzierenden und einem nicht-reduzierendem 6% SDS-Gel in Vergleich.

In beiden Gelen sind Banden in den Spuren des Serums 5 µg, des Serums 25 µg

und in FT1 zu sehen. In den Proben der IgM-Eluate E3, E6 und E40 sowie im Durchfluss FT13 und FT40 sind keine Banden sichtbar.

Dabei entsprechen im reduzierenden Gel (Abb. 11) die Banden bei 50 kDa erwartungsgemäß den schweren Ketten von IgG, die bei 65-70 kDa denen von IgM⁸⁰. Leichte Ketten bei 25 kDa sind nicht detektierbar. Aufgrund der Denaturierung ist eine Unterscheidung der Ig-Subklassen schlecht möglich. Im reduzierten Gel ist eine Bande bei 66,5 kDa sichtbar. Diese entspricht dem Serumalbumin (Abb. 11).

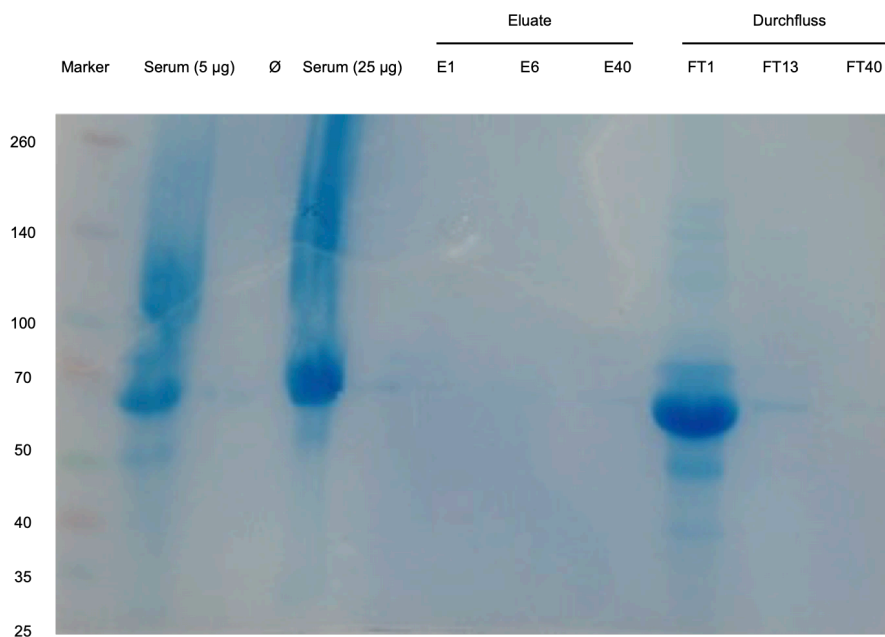


Abb. 11:
Reduzierendes SDS-Polyacrylamid-Gel nach Aufreinigung mittels IgM-Säule. Gezeigt ist ein reduzierendes SDS-Polyacrylamidgel. Es erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung folgender Proben: Marker, NMS 25 µg, neg. Kontrolle, NMS 5 µg sowie die IgM-Eluate E3, E6 und E40 und den Durchfluss FT1, FT13 und FT40. Die Banden wurden und mit Page Blue sichtbar gemacht. Als Standard diente der *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder*.

Die Banden im nicht-reduzierenden Gel (Abb. 12) liegen bei ca. 150 kDa (IgG) und 300 kDa (IgA). Die Pentamerform des IgM ist im nicht-reduziertem Gel bei 900-950 kDa nicht detektierbar. Das Molekül ist größer als der mit dem Gel mögliche detektierbare Bereich. Zusätzlich ist im nicht-reduzierten Gel auch eine Bande bei 50 kDa detektierbar. Diese entspricht der schweren Kette von IgG, so dass von einer leichten Denaturierung der Probe ausgegangen werden muss, also war es denaturiert.

Da aufgrund der geringen Proteinkonzentration keine sichtbaren Banden im Eluat nachweisbar waren, wurde der Ansatz nicht weiter verfolgt. Die vorhandene Probenmenge war zu gering für weitere Ankonzentrierungen.

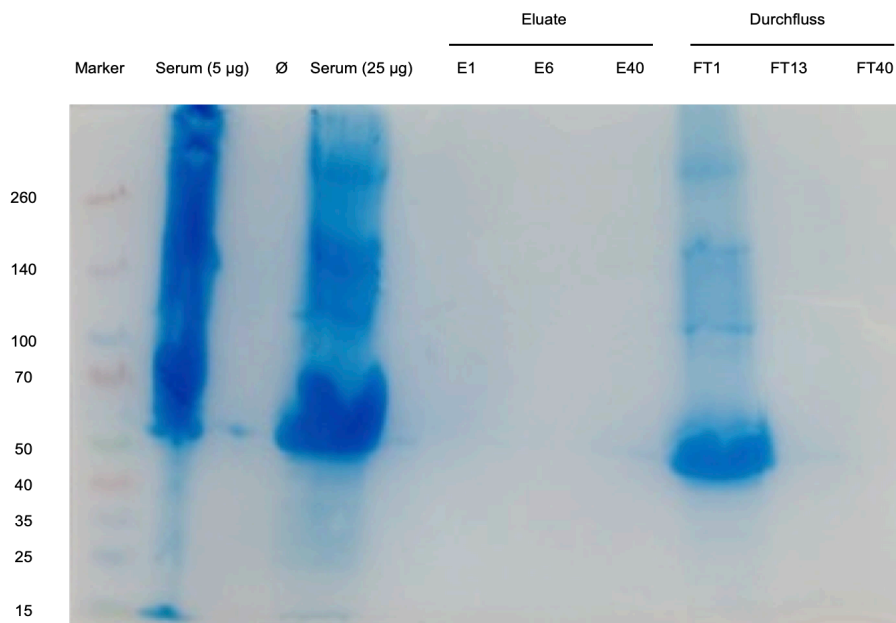


Abb. 12: Nicht-reduzierendes SDS-Polyacrylamidgel nach Aufreinigung mittels IgM-Säule. Gezeigt ist ein nicht-reduzierendes SDS-Polyacrylamidgel. Es erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung folgender Proben: Marker, NMS 25 µg, neg. Kontrolle (keine Probe), NMS 5 µg sowie die IgM-Eluate E3, E6 und E40 und den Durchfluss FT1, FT13 und FT40. Die Banden wurden mit Page Blue sichtbar gemacht. Als Standard diente der *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder*.

3.5. Bestimmung der Konzentration von IgG, IgM und IgA in NMS im ELISA nach Aufreinigung mittels Dialyse

Da die Aufreinigung von IgM über eine Säule noch mit einem beträchtlichen Anteil IgG verunreinigt war (Abschnitt 3.3), wurde in einem Alternativerfahren mittels 120 kDa MWCO Dialyseschlauch versucht IgG-Antikörper aus dem NMS abzutrennen (Abschnitt 2.13).

In der Auswertung des nachfolgenden ELISAs zeigte sich, dass die ermittelten Antikörperkonzentration von IgG (2285,8 µg/ml), IgM (2083,9 µg/ml) und IgA (2808,7 µg/ml) im hier verwendeten NMS vor der Aufreinigung im Bereich der in der Literatur beschriebenen Normwerte 2000-5000 µg/ml für IgG, 800-6500 µg/ml für IgM und 1000-3200 µg/ml für IgA (Tab. 4)⁷⁹ liegen. Von allen Antikörpern (IgG: 2285,8 µg/ml; 31,8%, IgM: 2083,9 µg/ml; 29,0% und IgA: 2808,7 µg/ml; 39,1%) sind hier im NMS allerdings annähernd gleiche Mengen gemessen worden.

Es zeigt sich, dass im Dialysat eine gewisse Menge von IgM (20,3%) vorlag; allerdings auch große Mengen IgA (26,7%) und IgG (53,0%) (Tab.8).

Somit ist eine Abtrennung von IgG über eine Dialyse leider nicht möglich, Dialyseschläuche mit einem größeren MWCO waren nicht verfügbar.

	Volumen (ml)	IgG (µg/ml)	Gesamtmenge IgG (µg)	IgM (µg/ml)	Gesamtmenge IgM (µg)	IgA (µg/ml)	Gesamtmenge IgA (µg)
NMS Pool 3	5	2285,8	11429,1 (31,8%)	2083,9	10419,5 (29,0%)	2808,7	14043,1 (39,1%)
Dialysat	2	9226,0	18452,0 (53,0%)	3531,3	7062,6 (20,3%)	4639,6	9279,2 (26,7%)

Tab. 8: Konzentration von IgG, IgM und IgA in NMS und im Dialysat nach Aufreinigung mittels 120 kDa Dialyseschlauch. Gezeigt sind die Konzentrationen der jeweiligen Antikörper IgG, IgM und IgA in NMS und im Dialysat nach Aufreinigung mittels 120 kDa Dialyseschlauch. Es sind jeweils die vorhandenen Volumina in ml, die Konzentrationen der Antikörper in µg/ml sowie die Gesamtkonzentrationen der Antikörper je vorhandenen Volumina (auch in Prozent) angegeben.

3.6. Bestimmung der Konzentration von IgG, IgM und IgA in NMS und EBA-Serum im ELISA nach Aufreinigung mittels kombinierter IgG- und IgM-Säule

Da nach Aufreinigung über die IgM Säule noch Verunreinigungen mit IgG im Eluat vorhanden waren (Abschnitt 3.3) und eine Abtrennung von IgG über eine Dialyse nicht möglich war (Abschnitt 3.5), versuchte ich im nächsten Schritt eine Abtrennung von IgG über eine Säule durchzuführen, bevor eine Aufreinigung mit einer IgM Säule durchgeführt wurde.

Hierzu wurde die kommerziell erworbene IgM-Säule mit einer davor laufenden IgG-Säule in einem Pumpensystem (Abschnitt 2.14) kombiniert. Das Mausserum wurde somit zuerst über die IgG-Säule laufen gelassen. Der Durchfluss und das IgG-Eluat wurden im Anschluss über eine 5 ml IgM-Säule aufgereinigt. Zur Aufreinigung größerer Mengen von NMS und EBA-Serum wurde eine selbst hergestellte 20 ml IgM Säule verwendet (Abschnitte 2.14). Der Durchfluss und das Eluat der IgG und IgM-Säulen wurden anschließend für die Bestimmung der Immunglobulinkonzentration verwendet.

3.6.1. Analyse der Immunglobulin Subklassen nach Aufreinigung von NMS

Nach Aufreinigung mittels kommerziell erworbener IgM-Säule mit davor laufender IgG-Säule befand sich im aufgereinigten IgG-Eluat des NMS fast ausschließlich IgG (93,4%). IgM (2,4%) und IgA (4,5%) waren nur schwach nachweisbar. Im Durchfluss (FT) nach der IgG-Säule war wie erwartet fast kein IgG (0,1%) zu finden, dafür aber eine gewisse Menge an IgM (21,5%) und viel IgA (78,4%). Im aufgereinigten IgM-Eluat befindet sich viel IgM (78,4%). IgG ist fast gar nicht (0,1%), eine gewisse Menge an IgA (21,5%) vorhanden. Im Durchfluss (FT) nach der IgM-Säule ist sehr

viel IgA (89,4%). IgG (0,1%) ist kaum zu finden. Jedoch befindet sich auch noch gewisser Teil an IgM (10,5%) im Durchfluss (FT) (Tab.9).

	Volumen (ml)	IgG (µg/ml)	Gesamtmenge IgG (µg)	IgM (µg/ml)	Gesamtmenge IgM (µg)	IgA (µg/ml)	Gesamtmenge IgA (µg)
NMS Pool 4	2,3	2308,2	5308,9 (39,4%)	521,0	1198,0 (8,9%)	3021,8	6950,1 (51,6%)
Eluat IgG-Säule	5	742,4	3712,0 (93,1%)	19,4	97,0 (2,4%)	35,5	177,5 (4,5%)
FT IgG-Säule	5,5	1,8	9,9 (0,1%)	299,0	1644,5 (21,5%)	1090,4	5997,2 (78,4%)
Eluat IgM-Säule	1,0	0,1	0,1 (0,1%)	86,0	86,0 (78,4%)	23,6	23,6 (21,5%)
FT IgM-Säule	1,0	2,4	2,4 (0,1%)	245,8	245,8 (10,5%)	2083,7	2083,7 (89,4%)

Tab. 9: Konzentration von IgG, IgM und IgA in NMS, in dessen IgM- und IgG-Eluat sowie dem jeweiligen Durchfluss FT nach Aufreinigung mittels kombinierter IgG- und kleiner IgM-Säule.

Gezeigt sind die Konzentrationen der jeweiligen Antikörper IgG, IgM und IgA in NMS, in dessen IgM- und IgG-Eluat sowie dem jeweiligen Durchfluss (FT) nach Aufreinigung mittels kombinierter IgG- und kleiner IgM-Säule. Es sind jeweils die vorhandenen Volumina in ml, die Konzentrationen der Antikörper in µg/ml sowie die Gesamtkonzentrationen der Antikörper pro vorhandenem Volumen angegeben. Die Prozentangaben zeigen die Menge der jeweiligen Antikörper am Gesamtimmunglobulin, die nach Aufreinigung im Eluat und Durchfluss FT noch vorhanden ist. Als Ausgangsmenge für das IgG-Eluat sowie den FT nach IgG-Säule dient das NMS, für das IgM-Eluat sowie den FT nach IgM-Säule der FT nach IgG-Säule.

Nach Aufreinigung mittels selbst hergestellter IgM-Säule mit davor laufender IgG-Säule zum Erhalt größerer Mengen an IgM befand sich im aufgereinigten IgG-Eluat ebenfalls fast ausschließlich IgG (99,2%). IgM (0,3%) und IgA (0,5%) waren kaum vorhanden. Im aufgereinigten IgM-Eluat befand sich viel IgM (57,9%). IgG ist kaum (6,2%), ein etwas größerer Anteil von IgA aber (35,9%) auch vorhanden. Im Durchfluss (FT) nach der IgM-Säule ist viel IgA (72,8%) und eine gewisse Menge an IgG (21,8%) zu finden. Jedoch befindet sich auch noch ein kleiner Teil an IgM (5,4%) im Durchfluss (FT) (Tab.10).

Um die entsprechende Menge an Antikörpern für die nachfolgenden Versuche zu erhalten, wurde die kombinierte IgG- und IgM-Säulen-Aufreinigung mehrfach durchgeführt. Der prozentuale Anteil betrug im IgG-Eluat (1 ml) 98,6% IgG, 0,4% IgM und 1,0% IgA; im IgM-Eluat (1 ml) 4,1% IgG, 55,3% IgM und 40,6% IgA.

	Volumen (ml)	IgG (µg/ml)	Gesamtmenge IgG (µg)	IgM (µg/ml)	Gesamtmenge IgM (µg)	IgA (µg/ml)	Gesamtmenge IgA (µg)
NMS Pool 5	7,0	1773,9	12417,3 (56,8%)	456,9	3198,3 (14,6%)	892,5	6247,5 (28,6%)
Eluat IgG-Säule	4,5	1736,9	7816,1 (99,2%)	5,7	25,7 (0,3%)	8,6	38,7 (0,5%)
Eluat IgM-Säule	3,5	15,4	53,9 (6,2%)	143,1	500,9 (57,9%)	88,7	310,5 (35,9%)
FT IgM-Säule	9	315,3	2837,7 (21,8%)	78,7	708,3 (5,4%)	1055,5	9499,5 (72,8%)

Tab. 10: Konzentration von IgG, IgM und IgA in NMS, in dessen IgM- und IgG-Eluat sowie im Durchfluss FT nach IgM-Säule nach Aufreinigung mittels großer IgM-Säule. Gezeigt sind die Konzentrationen der jeweiligen Antikörper IgG, IgM und IgA in NMS, in dessen IgM- und IgG-Eluat sowie im Durchfluss FT nach IgM-Säule nach Aufreinigung mittels großer IgM-Säule. Es sind jeweils die vorhandenen Volumina in ml, die Konzentrationen der Antikörper in µg/ml sowie die Gesamtkonzentrationen der Antikörper pro vorhandenen Volumina angegeben. Die Prozentangaben zeigen die Menge der jeweiligen Antikörper am Gesamtimmunglobulin, die nach Aufreinigung im Eluat und Durchfluss FT noch vorhanden ist. Als Ausgangsmenge für das IgG-Eluat sowie den FT nach IgG-Säule dient das NMS, für das IgM-Eluat sowie den FT nach IgM-Säule der FT nach IgG-Säule.

3.6.2. Analyse der Subklassen nach Aufreinigung von EBA-Serum

Da die Isolation aus NMS mittels kombinierter IgG- und IgM-Säule erfolgreich durchgeführt werden konnte (Abschnitt 3.6.1.), habe ich im Anschluss die Isolation aus EBA-Serum mittels diesem Aufreinigungsverfahren durchgeführt.

Nach dieser kombinierten Aufreinigung befand sich im aufgereinigten IgG-Eluat fast ausschließlich IgG (99,7%). IgM (0,1%) und IgA (0,2%) waren kaum nachweisbar. Im aufgereinigten IgM-Eluat befand sich fast ausschließlich IgM (87,8%) und wenig IgG (4,3%) und IgA (7,9%). Im Durchfluss (FT) nach der IgM-Säule war viel IgA (62,5%), ein noch etwas größerer Anteil von IgG (26,4%) sowie noch etwas IgM (11,1%) zu finden. Im EBA-Serum vor Aufreinigung zeigten sich weitgehend die zu erwartenden Konzentrationen von IgG, IgM und IgA (2000-5000 µg/ml für IgG, 800-6500 µg/ml für IgM und 1000-3200 µg/ml für IgA (Tab. 4)⁷⁹) im ELISA: Konzentrationen von IgG (4859,3 µg/ml), IgM (306,3 µg/ml) und IgA (534,2 µg/ml) (Tab.11).

Um die entsprechende Menge an Antikörpern für die nachfolgenden Versuche zu erhalten, wurde die kombinierte IgG- und IgM-Säulen-Aufreinigung mehrfach durchgeführt. Der prozentuale Anteil betrug im IgG-Eluat (1ml) 99,5% IgG, 0,2% IgM und 0,3% IgA; im IgM-Eluat 22,6% IgG, 53,8% IgM und 23,6% IgA.

Die Eluate von IgM und IgG aus NMS und EBA-Serum wurden anschließend auf 0,4 mg/ml mit PBS eingestellt und entsprechend aliquotiert.

	Volumen (ml)	IgG (µg/ml)	Gesamtmenge IgG (µg)	IgM (µg/ml)	Gesamtmenge IgM (µg)	IgA (µg/ml)	Gesamtmenge IgA (µg)
EBA-Serum	12,0	4859,3	58311,6 (85,2%)	306,3	3682,8 (5,4%)	534,2	6410,4 (9,4%)
Eluat IgG-Säule	1,25	33460,3	41825,0 (99,7%)	52,4	65,5 (0,1%)	62,1	77,6 (0,2%)
Eluat IgM-Säule	7,0	0,6	4,2 (4,3%)	12,2	94,0 (87,8%)	1,1	7,7 (7,9%)
FT IgM-Säule	3,5	66,0	231,0 (26,4%)	27,8	97,3 (11,1%)	156,0	546,0 (62,5%)

Tab. 11: Konzentration von IgG, IgM und IgA im EBA-Serum mittels kombinierter IgG- und IgM-Säule. Gezeigt sind die Konzentrationen der jeweiligen Antikörper IgG, IgM und IgA im EBA-Serum vor Aufreinigung und in dessen IgM- und IgG-Eluat sowie im Durchfluss FT nach IgM-Säule nach Aufreinigung mittels kombinierter IgG- und IgM-Säule. Es sind jeweils die vorhandenen Volumina in ml, die Konzentrationen der Antikörper in µg/ml sowie die Gesamtkonzentrationen der Antikörper pro vorhandenem Volumen angegeben. Die Prozentangaben zeigen die Menge der jeweiligen Antikörper, die nach Aufreinigung im IgG-Eluat noch vorhanden ist. Als Ausgangsmenge für das IgG-Eluat sowie den FT nach IgG-Säule dient das EBA Serum, für das IgM-Eluat sowie den FT nach IgM-Säule der FT nach IgG-Säule.

3.6.3. Analyse der Antigen-spezifischen Immunglobuline nach Aufreinigung von NMS und EBA-Serum

Um die Spezifität der aufgereinigten IgG- und IgM-Eluate des NMS und EBA-Serums zu überprüfen, wurde mittels Antigen-spezifischem ELISA getestet, ob die Antikörper in diesen Eluaten an mCol7^{vWFA2} binden (Kapitel 2.10).

Im IgM-Eluat und IgG-Eluat des NMS sind quasi keine Antigen-spezifischen Antikörper nachweisbar. Es sind nur minimal die spezifische Antikörper der IgM (0,7 µg/ml; 100%) bzw. IgG (0,2 µg/ml; 100%) Subklasse nachweisbar. Da diese Tiere nicht mit mCol7^{vWFA2} immunisiert wurden, ist dies als unspezifischer Hintergrund zu betrachten. Die isolierten IgM-Antikörper des NMS waren somit nicht wie erwartet komplett negativ für mCol7^{vWFA2}-spezifische Antikörper aller Subklassen. Da der Anteil jedoch im Vergleich zum EBA-Serum deutlich geringer war, wurde das Serum für die weiteren Analysen in der Immunfluoreszenz und die ROS-Freisetzung verwendet.

Das IgG-Eluat des EBA-Serums weist hingegen erwartungsgemäß eine deutlich sichtbare Menge an spezifischem anti-mCol7^{vWFA2}-IgG auf (53,7 µg/ml; 100%) Im

IgM-Eluat des EBA-Serums zeigt sich des Weiteren eine höhere spezifische anti-mCol7^{vWFA2}-IgM-Konzentration (11,2 µg/ml; 38,5%), als die im IgM-Eluat des NMS (0,7 µg/ml; 100%). Neben dieser befindet sich jedoch auch eine fast vergleichbare Menge an spezifischem anti-mCol7^{vWFA2}-IgG im IgM-Eluat (16,4 µg/ml; 56,4%). Da der mCol7^{vWFA2}-spezifische ELISA jedoch keine absoluten Werte angibt und stark von der Affinität der analysierten Antikörper abhängt, gibt dies keinen Hinweis auf die tatsächliche Menge mCol7^{vWFA2}-spezifischen IgGs im EBA-Serum (Tab. 12).

	Volumen (ml)	IgG (µg/ml)	Gesamtmenge IgG	IgM (µg/ml)	Gesamtmenge IgM	IgA (µg/ml)	Gesamtmenge IgA
NMS Eluat IgM	1,0	0,0	0,0 (0,0%)	0,7	0,7 (100%)	0,0	0,0 (0,0%)
EBA-Serum Eluat IgM	1,0	16,4	16,4 (56,4%)	11,2	11,2 (38,5%)	1,5	1,5 (5,1%)
NMS Eluat IgG	1,0	0,2	0,2 (100%)	0,0	0,0 (0,0%)	0,0	0,0 (0,0%)
EBA-Serum Eluat IgG	1,0	53,7	53,7 (100%)	0,0	0,0 (0,0%)	0,0	0,0 (0,0%)

Tab. 12: Antigen-spezifische Konzentration von IgG, IgM und IgA im IgG- und IgM-Eluat des gepooltem NMS und EBA-Serums nach Aufreinigung mittels kombinierter IgG- und IgM-Säule. Gezeigt sind die Konzentrationen der jeweiligen Antikörper der IgG, IgM und IgA Subklassen in den gepoolten IgG- und IgM-Eluaten des NMS und EBA-Serums nach Aufreinigung mittels kombinierter IgG- und IgM-Säule. Es sind jeweils die vorhandenen Volumina in ml, die Konzentrationen der Antikörper in µg/ml sowie die Gesamtkonzentrationen der Antikörper pro vorhandenem Volumen angegeben. Die Prozentangaben zeigen die Menge der jeweiligen Antikörper am Gesamtimmunglobulin, die nach Aufreinigung im Eluat noch vorhanden ist. Als Ausgangsmenge für das IgG-Eluat dient das NMS oder EBA-Serum, für das IgM-Eluat der entsprechenden FT nach IgG-Säule.

Die isolierten IgM-Aufreinigungen aus NMS und EBA-Serum wurden somit für die weitere Analyse verwendet.

3.7. Nachweis der Antikörperbindung in gesunder Haut durch indirekte Immunfluoreszenz

Mittels indirekter Immunfluoreszenz sollte überprüft werden, ob das gepoolte EBA-Serum sowie dessen aufgereinigte IgM- und IgG-Eluate eine Bindung auf gesunder Maushaut eingehen⁹⁵ (Abschnitt 2.14).

Die Proben wurden in einer Verdünnung von 1:5, 1:25 und 1:125 angesetzt und mit 1:100 verdünnten IgG- bzw. IgM-Sekundärantikörper detektiert. Als Negativkontrolle diente PBS.

Es zeigte sich zunächst, dass eine Inkubation mit EBA-Serum und sekundärem FITC-IgG-Antikörper zu einer linearen Bindung an der Basalmembran in Gefrierschnitten gesunder Maushaut bei einer Verdünnung von 1:125 führte, wohingegen bei der Verwendung von EBA-Serum und einem FITC-IgM-Sekundärantikörper keine lineare Bindung an der DEJ, sondern eher eine punktförmig angedeutete Linie bei 1:5 zu sehen ist. Die Negativkontrollen zeigten keine Bindungen.

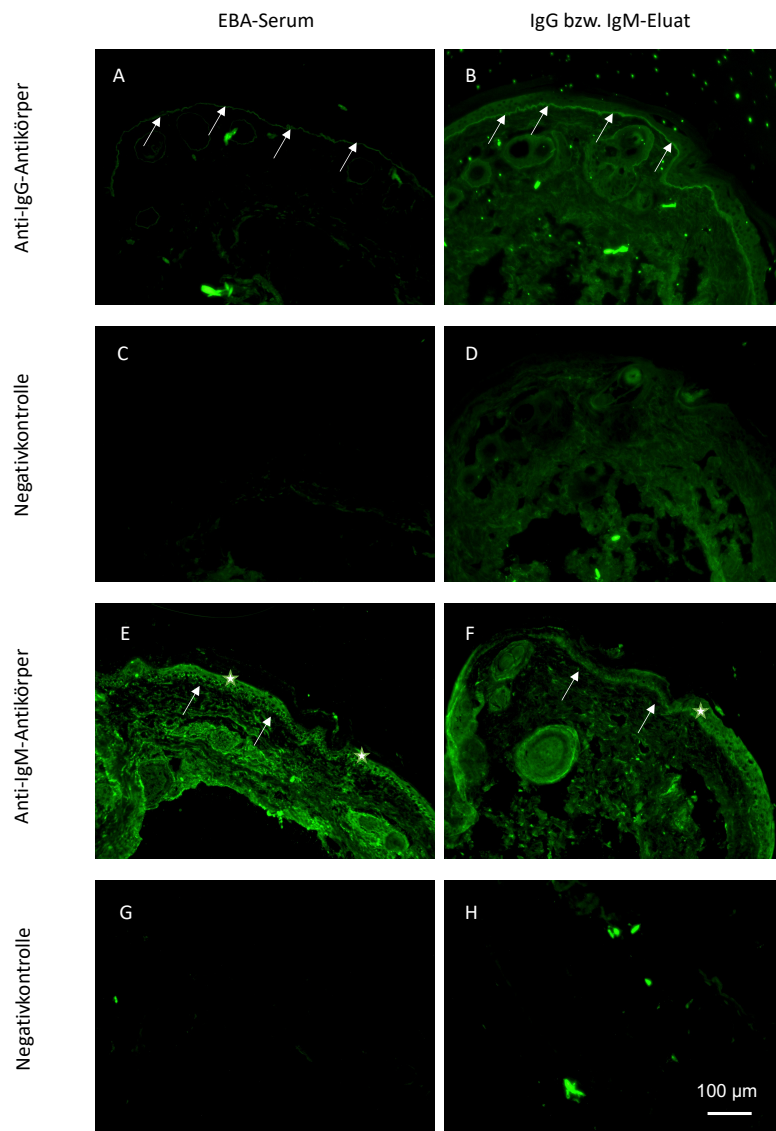


Abb. 13: Indirekte Immunfluoreszenz mit FITC-markiertem IgG- und IgM-Sekundärantikörper und EBA-Serum bzw. IgG- bzw. IgM-Eluat des EBA-Serums auf Gefrierschnitten normaler muriner Haut. Gezeigt sind das EBA-Serum (A, C, E und G) und dessen aufgereinigtes IgM- (F und H) und IgG-Eluat (B und D) sowie die Negativkontrollen aus PBS (C, D, G und H). In der IIF zeigte sich im EBA-Serum mit Anti-IgG-Antikörper eine lineare Bindung an der Basalmembran (Pfeil) bei einer Verdünnung von 1:125 (A) und in dessen IgG-Eluat bei einer 1:5-Verdünnung (B). Das EBA-Serum mit Anti-IgM-Antikörper (E) zeigte keine lineare Bindung an der DEJ (Pfeil), sondern eher eine punktförmig angedeutete Linie (*) bei einer Verdünnung von 1:5. IgM-Eluat war bei einer Verdünnung von 1:5 mittels Anti-IgM-Antikörper ebenfalls eine angedeutete breitere punktförmige Struktur (*) entlang der Basalmembran (Pfeil) zu beobachten. Die Negativkontrollen (C, D, G und H) zeigten keine Bindungen.

Anschließend wurde die Bindungsfähigkeit des aufgereinigten IgG- und IgM-Eluates des EBA-Serums überprüft. Nach der Inkubation mit aufgereinigtem IgG- oder IgM-Eluat aus EBA-Serum erfolgte die Zugabe der Sekundärantikörper gegen murines IgG oder IgM. Bei einer 1:5-Verdünnung des IgG-Eluates zeigte sich eine deutliche lineare Ablagerung an der DEJ nach Zugabe des Sekundärantikörpers IgG. Beim IgM-Eluat war bei einer Verdünnung von 1:5 mittels IgM-Sekundärantikörper keine schmale lineare Ablagerung, sondern eher wieder eine angedeutete breitere punktförmige Struktur entlang der Basalmembran zu beobachten. Die Negativkontrollen zeigten keine Bindungen (Abb. 13).

3.8. Stimulation von murinen Neutrophilen mit IC aus mCol7^{vWFA2} und aufgereinigtem IgM führt nicht zu einer Freisetzung von ROS

Zur Messung der Aktivität neutrophiler Granulozyten wurde in diesem Versuch die relative Menge freigesetzter ROS bestimmt. Die mit Hilfe des *Neutrophil Isolation Kit mouse* isolierten Granulozyten wurden anschließend durch IC bestehend aus Antigen (laborintern hergestelltes mCol7^{vWFA2}) und Antikörper (laborintern hergestelltes anti-mCol7^{vWFA2}-IgG bzw. IgM-Eluat aus EBA-Serum (anti-mCol7^{vWFA2}-IgM) aktiviert, um im ROS Release Assay die Aktivierbarkeit der isolierten neutrophilen Granulozyten zu prüfen. Es zeigte sich, dass die aufgereinigten IgM-Antikörper aus EBA-Serum in Form eines IC mit mCol7^{vWFA2} keinen immunmodulierenden Effekt aufweisen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied für anti-mCol7^{vWFA2}-IgM (Ak), mCol7^{vWFA2} (Ag) und den IC aus anti-mCol7^{vWFA2}-IgM mit mCol7^{vWFA2} im IgM-Eluat aus EBA-Serum. Eine Stimulation der neutrophilen Granulozyten durch anti-mCol7^{vWFA2}-IgG ergab hingegen wie erwartet eine für EBA typische signifikante ROS-Freisetzung. PMA als Positivkontrolle¹⁴⁴ (Rosfreisetzung) sowie neutrophile Graulozyten als Negativkontrolle (keine Rosfreisetzung) zeigten ebenfalls die erwarteten Reaktionen (Abb. 14).

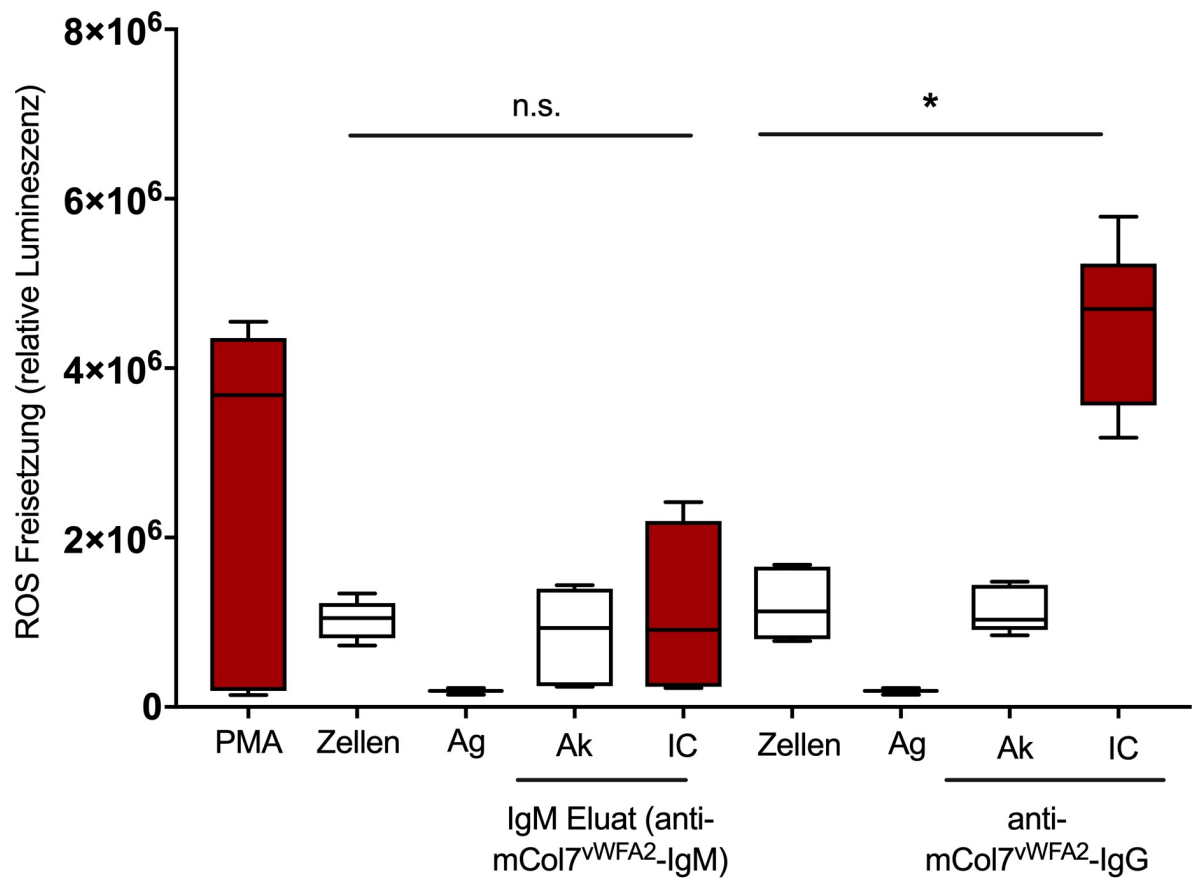


Abb. 14: ROS Release Assay mit anti-mCol7^{WFA2}-IgG und IgM-Eluat aus EBA-Serum (anti-mCol7^{WFA2}-IgM). Gezeigt ist die relative Menge freigesetzter ROS von frisch isolierten Granulozyten, welche durch IC bestehend aus Antigen (laborintern hergestelltes mCol7^{WFA2}) und Antikörper (laborintern hergestelltes anti-mCol7^{WFA2}-IgG und IgM-Eluat aus EBA-Serum (anti-mCol7^{WFA2}-IgM) aktiviert wurden. Die aufgereinigten IgM-Antikörper aus EBA-Serum wiesen in Form eines IC mit mCol7^{WFA2} keinen immunmodulierenden Effekt auf (kein signifikanter Unterschied für anti-mCol7^{WFA2}-IgM, mCol7^{WFA2} (Ag) und IC aus anti-mCol7^{WFA2}-IgM mit mCol7^{WFA2} im IgM-Eluat). Eine Stimulation der neutrophilen Granulozyten durch anti-mCol7-IgG ergab eine für die Neutrophilenaktivierung typische signifikante ROS-Freisetzung. PMA diente als Positivkontrolle (ROS-Freisetzung), die neutrophilen Granulozyten als Negativkontrolle (keine ROS-Freisetzung). Ag: Antigen; Ak: Antikörper; IC: Immunkomplex, n=6, Darstellung als Box- und Whisker Plot. Kruskal-Wallis-Test mit Bonferoni-Post-Test.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde zunächst ein geeignetes Verfahren zur Isolierung von IgM-Antikörpern aus gesundem murinem Serum entwickelt und anschließend an immunisierten Mäusen (EBA-Serum) angewandt. Im Verlauf wurden weitere Versuche durchgeführt: So sollte mittels IIF überprüft werden, ob IgM-Antikörper aus EBA-Serum eine Bindung an der Haut eingehen und ob diese ebenfalls eine Stimulation der Neutrophilen im ROS Release Assay verursachen. Hierbei zeigte sich, dass die Bindung von IgM an der der Haut im Vergleich zu IgG nur eine punktförmige Linie ergab (atypische Reaktion). Eine Stimulation von Neutrophilen durch IgM-Antikörper konnte nicht erzielt werden.

So sollte in der vorliegenden Arbeit herausgefunden werden, auf welchem Wege IgM-Antikörper mit einer hohen Reinheit und Ausbeute aus Mausserum isoliert werden können und ob diese an der Pathogenese der EBA involviert sein könnten.

Bisher wurde vor allem der nicht hemmende Einfluss von IgM-Antikörpern bei Entzündungen und Krankheiten im Rahmen mehrerer Mausmodelle^{52,64,67,106} sowie dessen Beteiligung an Autoimmunerkrankungen^{8,47,56,168} gezeigt werden. Des Weiteren sind in der Literatur in den letzten Jahren Fälle von IgM-induzierten bullösen Autoimmundermatosen beschrieben worden. Hierzu zählen u.a. auch Case Reports zur Epidermolysis bullosa acquisita (EBA), die nur durch die Immunglobulinklasse vom Typ IgM hervorgerufen worden sind^{139,171}. Außerdem wurden IgM-vermittelte Pemphigoid-Fälle berichtet, einer mit der EBA verwandten Erkrankung. 2015 wurde ein IgM-Schleimhautpemphigoid-Fall publiziert¹⁷³. Weiterhin wurden Fällen und Studien mit IgM (bullösem) Pemphigoid^{5,7,17,25,72,75,127,180,185} und vom brasilianischen Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem) berichtet, welcher eine IgM-Anti-Desmoglein1-Reaktion zeigte und dadurch den entscheidenden Unterschied zum Pemphigus foliaceus sowie anderen bullösen Autoimmunerkrankungen ausmacht⁴⁸. Außerdem wurden Fälle einer alleinigen IgM-Ablagerung^{75,180} sowie mit linearer IgM-Ablagerung an der DEJ bei vorliegender Schwangerschaft mit hetrogenem Phänotyp berichtet^{3,199}.

In einer Studie über den Pemphigus vulgaris ergaben die Untersuchungen der pathogenen Rolle von IgM-Antikörpern gegen Desmoglein 3 im Mausmodell hingegen keine Pathogenität¹⁷⁶.

Die Pathogenitätsfaktoren der EBA sowie deren auslösende Ursachen wurde bereits in vielen Experimenten untersucht⁹³. Die führenden Autoantikörpertypen dieser Autoimmunerkrankung sind normalerweise Immunglobuline vom Typ IgG und IgA^{35,182}, jedoch nicht die Immunglobuline der Klasse IgM^{35,182}. Isolierungsmethoden für IgG-Antikörper sind daher bereits gut etabliert^{63,81}, wohingegen die Isolierung von IgM-Antikörpern aus Mausserum bisher jedoch wenig untersucht¹⁴² wurde sowie kaum Fälle einer IgM-assoziierten EBA in der Literatur beschrieben worden sind^{139,171}. Daher bestand die Hauptschwierigkeit sowie das Ziel der vorliegenden Arbeit zunächst darin, eine geeignete Methode zur Isolierung der IgM-Antikörper aus gesundem murinem Serum zu entwickeln. Hierfür wurden unterschiedliche Ansätze in Betracht gezogen und im Rahmen dieser Arbeit etabliert.

Die im Vorwege ermittelten Konzentrationen der jeweiligen Antikörper IgG, IgM und IgA im gepoolten Serum gesunder Mäuse mittels ELISA waren mit denen in der Literatur vorliegenden Normwerten für IgG, IgM und IgA im Serum gesunder Mäuse übereinstimmend (Abschnitt 3.1.). Die Ermittlung der Kreuzreaktion der Antikörper IgG, IgM und IgA mit den verwendeten Sekundärantikörpern ergab im ELISA für alle untersuchten Antikörpern für den weiteren Versuchsablauf vernachlässigbare Werte (Beschichtung mit IgG: Serumverdünnung von 1:2500 eine 2,4%-ige Kreuzreaktion mit IgM und eine 0,6%-ige mit IgA; Beschichtung mit IgA: Serumverdünnung von 1:2500 eine 0,71%-ige Kreuzreaktion mit IgG und eine 9,8%-ige mit IgM; Beschichtung mit IgM: Serumverdünnung von 1:2500 eine 0,86%-ige Kreuzreaktion mit IgG und eine 4,29%-ige mit IgA) (Abschnitt 3.2.).

Im Rahmen der Arbeit wurden 3 verschiedene Methoden zu Reinigung von murinem IgM aus Mausserum getestet: (i) direkte Aufreinigung über eine kommerziell erwerbliche IgM Säule, (ii) Isolation über Dialyse und (iii) Abtrennung von IgG aus dem Serum und anschließend eine Aufreinigung über eine kommerziell erwerbliche IgM Säule. Die wirksamste Methode wurde anschließend zur Aufreinigung von IgM-

Antikörpern aus Serum von Mäusen mit experimenteller EBA verwendet. Eine potenzielle Pathogenität von IgM bei EBA wurde *in vitro* überprüft.

Im ersten Schritt war Ausgangspunkt und Grundlage der angestrebten IgM-Isolierung eine direkte einstufige Isolation mit Hilfe des *IgM-Purification Kit* (Abschnitt 2.11).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der prozentuale Anteil von IgM am Gesamtimmunglobulin im NMS bei 6% (3292,5 µg/ml) lag. Nach Aufreinigung mittels IgM-Säule war der prozentuale Anteil von IgM im aufgereinigten IgM-Eluat ca. 27% (892,1 µg/ml) der Gesamtmenge des IgM im NMS. Es befand sich wie erwartet der größte Anteil von IgG- und IgA-Antikörpern im Durchfluss. Eine große Menge von IgG und IgA konnte mittels dieser Methode somit entfernt werden. Dies zeigt einerseits den Erfolg der Methode, jedoch war im Vergleich zu IgM (46,3% der insgesamt gemessenen Immunglobuline im aufgereinigten IgM-Eluat) auch noch relativ viel IgG (33,7%) und IgA (20,0%) im aufgereinigten IgM-Eluat vorhanden (Tab. 7) (Abschnitt 3.3.).

Eine mögliche Ursache für die noch vorhandenen unerwünschten Mengen an IgG- und IgA-Antikörpern im IgM-Eluat sowie der IgM-Antikörper im Durchfluss könnte auf zu groß eingesetzte Volumina an Mausserum pro Durchlauf mit folgender Überladung der Säule hinweisen. Aufgrund eines Antikörperüberschuss könnten diese ins IgM-Eluat bzw. den Durchfluss gelangt sein. Andererseits könnten die IgM-Bindungsstellen von IgG- und IgA-Antikörpern und anderen Serumbestandteilen auch besetzt worden sein und dadurch IgM-Antikörper in den Durchfluss und IgG- sowie IgA-Antikörper ins IgM-Eluat gekommen sein.

Mittels Gelelektrophorese konnten im NMS Banden bei 50 kDa entsprechend den schweren Ketten von IgG und bei 65-70 kDa denen von IgM nachgewiesen werden. Leichte Ketten bei 25 kDa sowie die Pentamerform des IgM bei 900-950 kDa waren nicht detektierbar, da das IgM-Molekül größer ist als der mit dem Gel mögliche detektierbare Bereich. Im IgM-Eluat sowie im Durchfluss nach Aufreinigung von NMS mittels IgM-Säule waren keine Banden detektierbar (Abschnitt 3.4.). Dies könnte auf eine zu geringe Proteinkonzentration im aufgereinigten IgM-Eluat bzw. Durchfluss hinweisen oder ebenfalls aufgrund der Größe des Moleküls und den mit

dem Gel möglichen detektierbaren Bereich zurückzuführen sein. Die Verwendung einer größeren Menge an IgM-Eluat zur Erhöhung der Proteinkonzentration war leider nicht möglich, da die Menge an aufgereinigtem IgM-Eluat ansonsten aufgebraucht und keine weiteren Versuche möglich gewesen wären.

Aufgrund der zu großen verbleibenden Restmenge von IgG im aufreinigten IgM-Eluat hätte es möglicherweise zu einer Verunreinigung bzw. Verfälschung durch IgG-Antikörper in den in dieser Arbeit nachfolgenden *in vitro*-Versuchen (IIF, ROS Release Assay) kommen können, so dass mögliche falsch-positive Ergebnisse hätten entstehen können. Unsere Daten zeigen jedoch keine Aktivierung der Neutrophilen und keine lineare Antikörperdeposition, so dass die im Serum vorhandene IgG-Menge wahrscheinlich vernachlässigbar ist. Trotzdem könnte auch das Ergebnis weiterer Untersuchungen wie ein IgM-Antikörpertransfer in Mausmodelle dadurch beeinträchtigt sein. In diesem Fall könnte ein unsauberes aufgereinigtes IgM-Eluat mit zu hohen Mengen an immunem IgG (ca. 1 mg) eine mögliche EBA induzieren und den Effekt von IgM überlagern¹⁷⁰.

Daher bestand das weitere Ziel zunächst in der Abtrennung der vorhandenen IgG - Antikörper. Hierfür sollte in einem ersten Schritt ein großporiger Dialyseschlauch verwendet werden. Aufgrund des Molekulargewichtes von IgG hätte dieser eine Größe von über 150 kDa haben müssen, damit das IgG in den Puffer übertreten kann. Da es diesen jedoch nicht käuflich zu erwerben gab, verwendete ich einen mit 120 kDa MWCO (Abschnitt 2.13.). Schließlich erhielt ich im Dialysat IgM (20,3%), aber weder IgA (26,7% im Dialysat) noch IgG (53,0% im Dialysat) konnten abgetrennt werden (Tab. 8) (Abschnitt 3.5.), so dass dieser Methodenansatz vorerst ungeeigneter erschien, da das IgM bei der Dialyse nicht zurückgehalten werden konnte. Ein weiterer Grund für die nicht erfolgreiche Aufreinigung über eine Dialyse könnte ein entsprechender Anteil von Monomeren in der IgM-Fraktion sein⁹⁶. Diese liegen in geringen Konzentrationen bereits im Serum vor, könnten aber auch während der Säulenpreparation entstanden sein.

Da eine Ein-Schritt-Aufreinigung von IgM-Antikörpern und eine Abtrennung von IgG-Antikörpern mittels Dialyse vorerst nicht möglich war, führte ich eine Abtrennung von IgG aus dem Serum mittels einer IgG-Säule mit nachfolgender

Aufreinigung von IgM aus dem Durchfluss zunächst über die kleine 5 ml IgM-Säule des *IgM Purification Kit* und anschließend über eine kommerziell erwerbliche IgM-Säule durch. Im Verlauf konnten mit diesem Verfahren größere Volumina an relativ reinem IgM sowohl aus NMS als auch aus EBA-Serum aufgereinigt werden (Abschnitt 2.14.).

Im NMS befand sich nach kombinierter IgG- und IgM-Säulen-Aufreinigung (IgM-Säule des *IgM Purification Kit* sowie kommerziell erworbenen IgM-Säule) im IgG-Eluat fast ausschließlich IgG (93,1-99,2%), kaum IgM (0,3-2,4%) und IgA (0,5-4,5%). Im IgM-Eluat befand sich überwiegend IgM (57,9-78,4%), kaum IgG (0,1-6,2%), aber auch immer noch eine relativ große Menge an IgA (21,5-35,9%). Im Durchfluss nach Aufreinigung mittels IgM-Säule zeigte sich viel IgA (72,8-89,4%) sowie das restliche IgG (0,1-21,8%). Es war jedoch auch noch etwas IgM (5,4-10,5%) dort vorhanden (Tab. 9 und Tab. 10). Nach einer Aufreinigung von einer Gesamtmenge von 21,8 ml NMS betrug der prozentuale Anteil im IgG-Eluat 98,6% IgG, 0,4% IgM und 0,1,0% IgA; im IgM-Eluat 55,3% IgG, 4,1% IgM und 40,6% IgA (Abschnitt 3.6.1.).

Im EBA-Serum befand sich nach kombinierter IgG- und IgM-Säulen-Aufreinigung (kommerziell erworbenen IgM-Säule) im aufgereinigten IgG-Eluat fast ausschließlich IgG (99,7%), kaum IgM (0,1%) und IgA (0,2%). Im aufgereinigten IgM-Eluat befindet sich fast ausschließlich IgM (87,8%), gerinfügig IgG (4,3%) und wenig IgA (7,9%). Im Durchfluss FT nach der IgM-Säule ist viel IgA (62,4%) sowie das restliche IgG (26,5%), aber auch noch etwas IgM (11,1%) (Tab. 11). Nach einer Aufreinigung von einer Gesamtmenge von 14,8 ml EBA-Serum betrug der prozentuale Anteil im IgG-Eluat 99,5% IgG, 0,2% IgM und 0,3% IgA; im IgM-Eluat 22,6% IgG, 53,8% IgM und 23,6% IgA (Abschnitt 3.6.2.).

Es konnte letztendlich zunächst im NMS und anschließend im EBA-Serum eine gewisse Menge an IgM isoliert werden, jedoch befand sich auch noch eine relativ große Menge an IgA und IgG im aufgereinigten IgM-Eluat.

Im Großen und Ganzen zeigte sich teilweise auch ein Verlust von IgM-Antikörpern als auch von IgG- und IgA- Antikörpern sowohl im NMS (Tab.9, 10 und 11) als auch im EBA-Serum (Tab. 12) nach der gesamten Aufreinigung, verglichen mit der

jeweiligen Antikörpermenge, die im NMS und EBA-Serum vor der Aufreinigung gemessen wurde (Abschnitt 3.6.).

Der Verlust von IgM-, IgG- und IgA-Antikörpern könnte möglicherweise auf die zahlreichen Zwischenschritte (z.B. Umpufferung, verschiedene Säulen, Einfrier-/Auftauprozesse etc.) zurückzuführen sein. Es ist bekannt, dass IgM-Antikörper im Allgemeinen eine niedrigere Ausbeute als IgG ergeben. Es wird von einer Ausbeute von ca. 0,1-2,5 mg/ml bei Aszitesflüssigkeit und 0,5-50 µg/ml bei im Hybridomaüberstand ausgegangen. Problematisch bei der Aufbewahrung von IgM-Antikörpern ist die richtige Pufferwahl. IgM präzipitiert selbst in PBS sehr leicht aus. Mittels Erhöhung der Ionenkonzentration des Puffers z. B. mit NaCl können IgM-Präzipitate jedoch wieder aufgelöst werden. IgM kann bei 4°C oder -70°C gelagert werden, sollte jedoch nicht mehrfach eingefroren und aufgetaut werden⁴.

Des Weiteren könnte durch den Einsatz einer vorgeschalteten IgA-Säule vielleicht eine Beseitigung der großen Mengen an IgA im IgM-Eluat möglich sein. Um noch reineres IgM-Eluat zu erhalten könnten auch mehrere Läufe über die jeweilige IgG-, IgM- und ggf. IgA-Säule in Erwägung gezogen werden. Außerdem könnte durch den Einsatz kleinerer Volumina pro Durchlauf eine Überladung möglicherweise verhindert werden. Die prozentualen Schwankungen der erhaltenen einzelnen Antikörper im Verlauf der Aufreinigungsprozesse lassen sich möglicherweise z.B. durch Ungenauigkeiten beim Durchführen und durch Messfehler des ELISAs erklären.

Um sicherzustellen, dass im aufgereinigten IgM jedoch auch ein nachweisbarer Anteil mCol7^{WFA2}-spezifischen IgM vorhanden ist, wurde ein entsprechender ELISA durchgeführt. Hierbei zeigten sich nur spezifische Bindungen der jeweilig eluierten Antikörper IgM bzw. IgG aus EBA-Serum. Im IgG-Eluat des EBA-Serums konnte eine deutliche Antigen-spezifische Bindung von anti-mCol7^{WFA2}-IgG (53,7 µg/ml; 99,8%) nachgewiesen werden. Im IgM-Eluat des EBA-Serums zeigte sich ebenfalls eine spezifische anti-mCol7^{WFA2}-IgM Konzentration (11,2 µg/ml; 38,5%). Neben dieser befindet sich jedoch auch eine fast vergleichbare Menge an spezifischem anti- mCol7^{WFA2}-IgG im IgM-Eluat (16,4 µg/ml; 56,4%). Diese könnte auf eine mögliche unspezifische Kreuzreaktion des IgM oder aber auf eine Kontamination mit IgG-Antikörpern hinweisen. Der mCol7^{WFA2}-spezifische ELISA

gibt außerdem keine absoluten Werte an und hängt stark von der Affinität der analysierten Antikörper ab, somit gibt dies ebenfalls keinen Hinweis auf die tatsächliche Menge mCol7^{WFA2}-spezifischen IgGs im EBA-Serum. In den aufgereinigten IgG- und IgM-Eluaten aus NMS wurde quasi weder spezifisches IgG noch IgM (IgM (0,7 µg/ml; 100%) bzw. IgG (0,2 µg/ml; 100%) Subklasse) nachgewiesen (unspezifischer Hintergrund) (Tab. 12) (Abschnitt 3.6.3.).

Die isolierten IgM-Aufreinigungen aus NMS und EBA-Serum wurden somit für die weitere Analyse verwendet.

Das im Rahmen dieser Arbeit hergestellte IgM aus EBA-Serum soll in folgenden Projekten verwendet werden, um zu untersuchen, ob es möglich ist, in Tieren unter Verwendung von anti-mCol7^{WFA2}-IgM allein ein Erkrankungsbild der experimentellen EBA auszulösen. Hierzu ist eine Injektion von IgM aus EBA-Serum in die Ohrbasis von Mäusen geplant. Eine Injektion von IgG aus EBA-Serum führt in diesem Modell zu einer Verdickung der Ohren mit Blasenbildung und Verkrustung¹⁰¹.

Über diese Methode ist es möglich zu bestimmen, ob IgM-Antikörper tatsächlich eine murine EBA verursachen können oder ob es sich vielleicht doch nur um eine Vorstufe z.B. beim Übergang von IgM zu IgG-Antikörpern im Rahmen der Immunantwort handelt.

Des Weiteren ist es von Interesse zu untersuchen, ob das Erkrankungsbild vom typischen Bild einer experimentellen EBA abweicht. Es wurden bereits Case Reports zur Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) publiziert^{139,171}, in welchem nur durch die Immunglobulinklasse vom Typ IgM eine EBA hervorgerufen worden seien. Hier hatte sich z.T. ein schwächerer Verlauf gezeigt (spontan oder durch geringfügige Traumata an Kopf, Abdomen sowie den unteren Extremitäten entstehende Hautblasen, Krustenbildung mit kleinen Narben, subepidermale Spaltbildung mit geringfügigem Entzündungsinfiltrat¹⁷¹; milderer Phänotyp (keine Blasen am Kopf, minimale Narben), stoßweise auftretende epidermale Blasenbildung sowie Fragilität an den Fingern, Ellenbogen und dorsalem Handrücken sowie am Gesäß, subepidermale Blasen und eine geringfügige Vasodilatation mit wenig Lymphozyten).

Obwohl zwar bereits einige Methodenansätze (affinitätschromatographische und nicht-affinitätschromatographische) zur IgM-Aufreinigung aus Mausproben beschrieben worden sind, bestand das Hauptproblem dieser Doktorarbeit jedoch zunächst darin, dass bisher kaum erfolgreiche Methoden zur Gewinnung von IgM-Antikörpern aus Serum bekannt sind.

In einer Arbeit von Gautam et al. sind die Einschränkungen und Herausforderungen, die mit den aktuellen IgM-Aufreinigungsstrategien verbunden sind, v.a. der Affinitätschromatographie und deren Potenzial zur IgM-Aufreinigung, zusammengefasst⁶⁰. Die Isolation erfolgte u.a. meist aus Aszites oder Zellkulturüberstand^{4,86,100,141}. Die meisten der bisher beschriebenen Affinitätsliganden zur IgM-Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie^{76,86,131,132,162,191} zeigten eine spezifische Bindung von IgM sowie eine einfache Isolierung von reinen und aktiven IgMs. Die Verwendung dieser natürlichen Antikörper-bindenden Liganden war jedoch kostspielig, zeitaufwendig und nicht effizient wie z.B. herkömmliche Reinigungsverfahren (Kombination klassischer chromatographischer Techniken wie Gelfiltration, Ionenaustausch oder hydrophobe Wechselwirkung)¹⁴².

Calciumabhängige Lektine wie MBP oder Komplementfaktor C1q z.B. sind für industrielle Anwendungen nicht geeignet (u.a. hohe Herstellungskosten, geringe Antikörperbindungskapazität, begrenzte Stabilität und Wiederverwendbarkeit) und können nicht zur IgM-Reinigung aus Seren verwendet werden (Affinität für andere Immunglobulin-Isotypen IgD und IgA)¹⁴².

Während Protein A, Protein G und Protein A/G IgM nicht gut binden, zeigt Protein L eine Affinität für IgM. Jedoch bindet Protein L auch andere Immunglobulin-Isotypen (IgG und IgA) gut, wodurch die Anwendung von Protein L als Affinitätsligand für die IgM-Reinigung begrenzt ist².

Alternativ wurde z.B. das synthetischen Peptid TG19318 beschrieben, mittels dem IgM aus Aszites und Zellkulturüberständen sowie ebenfalls aus Serum isoliert werden konnte. Die Antikörperreinheit nach Affinitätsreinigung war sehr hoch und lag fast bei 85-95%. Die Säulenkapazität lag im Bereich von 2-8 mg IgM/ml. Nachteilig zeigte sich jedoch auch eine Bindung an IgG, IgA, IgE und IgY¹⁴².

In den letzten Jahren hat die Zahl der Anbieter, die Lösungen für die IgM-Aufreinigung aus u.a. Serum, Aszites, Hybridomzellkulturüberständen anbieten, auf

dem kommerziellen Markt zugenommen, sodass eine Vielzahl von kommerziellen Kits zur Reinigung von IgM verfügbar ist⁴.

Des Weiteren sind bis jetzt nur sehr wenige Fälle hinsichtlich einer IgM-assoziierten EBA und anderer IgM-assoziiierter Autoimmunerkrankungen beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl ein IgM-Isolierungs-Verfahren etabliert als auch mittels dieses relativ spezifisch IgM-Antikörper aus NMS und EBA-Serum weitestgehend isoliert werden. Das von den in dieser Doktorarbeit untersuchte und effizienteste Verfahren war die Kombination eines hintereinandergeschalteten IgG- und IgM-Säulen-Systems. Trotz dieser Kombination wurden jedoch weiterhin Verunreinigungen in Form von IgG- und IgA-Antikörpern im aufgereinigten IgM-Eluat (IgM-Eluat aus NMS: IgA (40,6%), kaum IgG (4,1%); IgM-Eluat EBA-Serum: IgA (23,6%), IgG (22,6%)) festgestellt. Mit Hilfe der vorgeschalteten IgG-Säule konnten zumindest die IgG-Antikörper zu großen Teilen eliminiert werden, so dass das aufgereinigte IgM-Eluat nach Abschluss aller Aufreinigungsschritte diesbezüglich in relativ reiner Form vorlag. Die IgA-Antikörper konnten nur teilweise entfernt werden. Außerdem zeigte sich, dass ein gewisser Anteil von IgM noch im Durchfluss vorhanden und dass bei allen Verfahren zum Teil IgM sowie IgG und IgA verloren gegangen waren.

Das etablierte hintereinandergeschaltete IgG- und IgM-Säulen-System bietet eine mögliche Grundlage für einen weiteren Ausbau sowie Verbesserungen der Isolierungsmethoden von IgM-Antikörpern und mögliche weitere Versuchsansätze hinsichtlich der Pathogenese der EBA.

Neben der Durchführung von in vivo Experimenten ist es auch möglich, die Pathogenität des aufgereinigten IgM aus EBA-Serum vorherzusagen. Hierdurch kann eine mögliche Aussage darüber gemacht werden, ob IgM-Antikörper im EBA-Serum eine Rolle spielen und wenn, ja welche. Handelt es sich hierbei lediglich um den möglichen Kompensationsmechanismus zur Regulation erhöhter IgG-Titer oder tatsächlich um IgM-Autoantikörper, die eine alleinige Ursache für eine EBA darstellen mögen.

Dies sollte zunächst mittels weiterer Versuche in vitro wie der indirekten Immunfluoreszenz (Abschnitt 2.15.) und dem ROS Release Assay (Abschnitt 2.16) untersucht werden.

Die indirekte Immunfluoreszenz ergab nach Inkubation von EBA-Serum und sekundärem FITC-IgG-Antikörper eine lineare Bindung an der Basalmembran in Gefrierschnitten gesunder Maushaut bei einer Verdünnung von 1:125, wohingegen bei der Verwendung von EBA-Serum und einem FITC-IgM-Sekundärantikörper keine lineare Bindung, sondern eher eine atypische punktförmig angedeutete Linie bei 1:5 zu sehen war.

Nach der Inkubation von IgG- oder IgM-Eluat aus EBA-Serum mit entsprechendem Sekundärantikörper IgG oder IgM zeigte sich eine deutliche lineare Ablagerung an der DEJ bei einer 1:5-Verdünnung des IgG-Eluates, beim IgM-Eluat war bei einer Verdünnung von 1:5 eher wieder eine angedeutete atypische breitere punktförmige Struktur entlang der Basalmembran zu beobachten.

Hingegen der Erwartungen zeigte sich im EBA-Serum sowie in dessen aufgereinigtem IgM-Eluat keine eindeutige lineare Ablagerung, sondern eine atypische punktförmig angedeutete Linie, bei welcher es sich möglicherweise um die Ablagerungen eines IgM-Antikörpers, passend zu dessen Pentamerstruktur, handeln könnte. Andererseits wäre hierbei auch lediglich ein Artefakt zu erwägen (Abschnitt 3.7.).

Entscheidend für die Fragestellung, ob IgM-Antikörper eine EBA induzieren können, sollte zuletzt durch den ROS Release Assay geklärt werden. Eine Bindung von IgM-Antikörper an der Haut hatte im Vergleich zu IgG bereits im Vorwege zwar keine typische lineare Ablagerung gezeigt, jedoch war eine angedeutete breitere punktförmige Struktur zu erkennen, wobei es sich möglicherweise um die pentamere Struktur des IgM-Antikörpers handeln könnte. Eine IgM-Stimulation von Neutrophilen bewirkt jedoch letztendlich keine ROS-Freisetzung. Hier hatte sich kein signifikanter Unterschied für anti-mCol7^{vWFA2}-IgM, mCol7^{vWFA2} und den IC, bestehend aus anti-mCol7^{vWFA2}-IgM und mCol7^{vWFA2}, im IgM-Eluat aus EBA-Serum gezeigt, da die IgM-Bindung möglicherweise dafür nicht ausreichend ist oder IgM-Antikörper einfach keine EBA induzieren. Eine Stimulation der neutrophilen Granulozyten durch anti-mCol7^{vWFA2}-IgG ergab hingegen wie erwartet eine typische signifikante ROS-Freisetzung. Somit reicht ein IC aus anti-mCol7^{vWFA2}-IgM und mCol7^{vWFA2}, offensichtlich nicht für eine Stimulation der Neutrophilen aus. Die Freisetzung von ROS aus infiltrierenden Neutrophilen spielt jedoch eine entscheidende Rolle für die Blasenbildung bei der EBA (Haupteffektor), was bereits

in zahlreichen experimentellen EBA-Modellen gezeigt werden konnte^{37,71,104,115}. Eine ausbleibende Reaktion wie im Falle des hier aufgereinigten IgM-Eluates sollte somit auch keine Entzündung hervorrufen können (Abschnitt 3.8)

Allerdings wurden Fälle beschrieben, bei denen durch IgM-Antikörper eine EBA hervorgerufen worden sei^{139,171}.

Nun könnten im hier aufgereinigten IgM-Eluat aus EBA-Serum vielleicht nicht ausreichend pathogene IgM-Antikörper für die Stimulation neutrophiler Granulozyten für eine ROS-Freisetzung vorhanden gewesen sein. Eine erneute Überprüfung mit einer höheren Konzentration an IgM im aufgereinigten EBA-Serum könnte daher hilfreich und wegweisend sein.

Allerdings könnte es jedoch auch möglich sein, dass es sich hierbei gar nicht um eine nur durch IgM-Antikörper ausgelöste EBA, sondern womöglich eher um eine durch IgG-Antikörper erzeugte klassische Form der EBA handelt, welche möglicherweise viel mehr beim Übergang von IgM zu IgG-Antikörpern im Rahmen der klassischen Immunantwort festgestellt wurde.

In der Literatur wurde berichtet, dass vorhandene IgM-Antikörper möglicherweise neben einer pathologischen Rolle auch eine protektive Funktion im Rahmen von Autoimmunerkrankungen und anderen Erkrankungen ausüben können³⁸.

In einer Arbeit von Jones et al.⁸⁹ werden u.a. protektive Eigenschaften von IgM zusammengefasst: bei Autoimmunerkrankungen wie z.B. dem systemischen Lupus erythematoses ist der IgM-Titer erhöht und das anti-dsDNA-IgM wird als schützend angesehen¹⁹². Im Rahmen von Krebserkrankungen sind natürliche IgMs mit der Erkennung und Entfernung von Krebsvorstufen assoziiert¹⁴⁵.

Neu entdeckte IgM-Antikörper spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der lokalen Homöostase an Schleimhautstellen wie Darm und Lunge, helfen bei der Gestaltung lokaler Mikrobiota und tragen bei der Regulierung bakterieller Infektionen, insbesondere an Schleimhautstellen bei^{118,188}.

Natürliche IgM-Antikörper, die gegen Pilzpathogene gerichtet sind, sind sowohl für die komplementabhängige als auch für die unabhängige Erkennung und Clearance von Pilzen wichtig¹⁷² und haben nachweislich direkte Abtötungseffekte¹⁹⁶ und tragen zur Opsonisierung und Abtötung vieler Viren bei¹⁰.

Außerdem sind Antikörper, insbesondere der IgM-Isotyp, bei Befall von Parasiten wichtig⁶.

Laut Literaturdaten trägt adaptives IgM möglicherweise zum humoralen Gedächtnis und zum langfristigen Schutz vor pathogenen Infektionen bei und eine Impfung könnte möglicherweise langfristige schützende IgM-Reaktionen hervorrufen⁶².

4.1. Ausblick

Die Herstellung eines Verfahrens zur Isolierung von IgM-Antikörpern aus NMS und EBA-Serum konnte erste Aspekte hinsichtlich möglicher IgM-Isolierungsmethoden, deren Problematik sowie die Rolle des IgM-Antikörpers als Ursache einer EBA zeigen. So könnte eine forcierte Überarbeitung des kombinierten IgG- und IgM-Säulen-Systems, ggf. auch mittels anderer Verfahrensansätze, die ausreichende Gewinnung reinen IgM möglich sein. Hierzu zählen z.B. eine Reduktion der zahlreichen Zwischenschritte sowie die Verwendung kleinerer Serummengen pro Isolierungsprozess. Andernfalls könnten ein mehrmaliger Lauf über IgG- und IgM-Säule sowie die zusätzliche Verwendung einer IgA-Säule die Reinheit des IgM-Eluats verbessern. Eine Dialyse mit einem größerporigem Dialyseschlauch könnte die Isolation komplettieren und relativ simpel zu einer Abtrennung von IgG und eventuellen IgM-Monomeren führen. Dieser könnte sowohl isoliert als auch in Kombination mit den entsprechenden Säulen möglicherweise erfolgreich sein. Anschließend wäre nach ausreichend reiner IgM-Herstellung eine erneute Durchführung einer Gelelektrophorese sowie eine Wiederholung der indirekten Immunfluoreszenz sinnvoll, um zu überprüfen, ob sich die o.g. Muster bei höherer Antikörperkonzentration bestätigen lassen, verstärken oder anders ausfallen. Eine Verbesserung der entwickelten Methode sowie der Herstellung ausreichender Mengen an reinem IgM könnte wiederum Möglichkeiten für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Pathogenese der EBA schaffen. Diese könnten für die Durchführung eines ROS Release Assay oder im Rahmen eines Mausmodells mit der Untersuchung histologischer Gewebeschnitte genutzt werden, wodurch die Rolle des IgM-Antikörpers bei der Entstehung und dem Verlauf der Krankheit weiter untersucht werden könnte.

5. Zusammenfassung

IgM wird als erster Antikörper während der primären Immunantwort gebildet. IgM reagiert zwar vereinzelt mit Auto-Antigenen, stellt aber in der Regel nicht die Ursache für Autoimmunerkrankungen dar. Der genaue Zusammenhang zwischen IgM-Antikörpern und Autoimmunerkrankungen konnte bisher noch nicht geklärt werden. Vermutet wird jedoch eher eine protektive Funktion, welche möglicherweise die Entwicklung von IgG-Autoantikörpern und Autoimmunerkrankungen verhindert. Es wurden IgM-Antikörper bei zahlreichen Autoimmunerkrankungen sowie dessen vor allem nicht hemmender Einfluss bei Entzündungen und Krankheiten im Rahmen mehrerer Mausmodelle beobachtet und beschrieben. Im Gegensatz hierzu wurde jedoch auch ein pathogener Zusammenhang von IgM-Antikörpern und Autoimmunerkrankungen (u.a. auch der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) und des Pemphigus vulgaris PV) berichtet. Anhand dieser Doktorarbeit sollte zunächst die Entwicklung einer Methode zur Isolierung von IgM-Antikörpern aus NMS und EBA-Serum etabliert werden. Es setzte sich das kombinierte IgG- und IgM-Säulen-System durch. Im allgemeinen ELISA konnte gezeigt werden, dass IgM-Antikörper weitestgehend sauber isoliert werden können. Gewisse Mengen an IgG und IgA waren im IgM-Eluat jedoch weiterhin noch nachweisbar. Im Antigen-spezifischen ELISA konnten spezifische Bindungen von IgM sowohl im IgM-Eluat aus NMS und EBA-Serum nachgewiesen werden. Letztere war erwartungsgemäß deutlich kräftiger. In der indirekten Immunfluoreszenz war im EBA-Serum und dessen IgM-Eluat eine atypische punktförmig angedeutete Linie an der DEJ nach der Inkubation mit FITC-markiertem IgM-Sekundärantikörper zu sehen. Eine anschließende IgM-Stimulation von Neutrophilen bewirkte jedoch letztendlich keine ROS-Freisetzung. Das hier entwickelte Verfahren zur Isolierung von IgM-Antikörpern bietet die Basis einer ausbaufähigen Methode oder für andere Isolierungsansätze sowie weitere zukünftig darauf aufbauende Versuchsmöglichkeiten.

6. Literaturverzeichnis

1. Abrams, M. L., Smidt, A., Benjamin, L., Chen, M., Woodley, D., & Mancini, A. J. Congenital epidermolysis bullosa acquisita: Vertical transfer of maternal autoantibody from mother to infant. *Arch Dermatol.* 2011; 147: 337–341.
2. Åkerström, B., & Björck, L. Protein L: an immunoglobulin light chain-binding bacterial protein: characterization of binding and physicochemical properties. *J Biol Chem.* 1989; 264: 19740–19746.
3. Alcalay, J., Ingber, A., Hazaz, B., David, M., & Sandbank, M. Linear IgM dermatosis of pregnancy. *J Am Acad Dermatol.* 1988; 18: 412–415.
4. Andrew, S. M., Titus, J. A., Amin, A., & Coico, R. Isolation of murine and human immunoglobulin M and murine immunoglobulin D. *Curr Protoc Immunol.* 2009; 85: 2–9.
5. Baardman, R., Horváth, B., Bolling, M. C., Pas, H. H., & Diercks, G. F. H. Immunoglobulin M bullous pemphigoid: An enigma. *JAAD Case Rep.* 2020; 6: 518–520.
6. Baral, T. N., De Baetselier, P., Brombacher, F., & Magez, S. Control of *Trypanosoma evansi* infection is IgM mediated and does not require a type I inflammatory response. *J Infect Dis.* 2007; 195: 1513–1520.
7. Barth, J. H., Kelly, S. E., & Wojnarowska, F., et al. Pemphigoid and ulcerative colitis. *J Am Acad Dermatol.* 1988; 19: 303–308.
8. Baudino, L., Fossati-Jimack, L., Chevalley, C., Martinez-Soria, E., Shulman, M. J., & Izui, S. IgM and IgA anti-erythrocyte autoantibodies induce anemia in a mouse model through multivalency-dependent hemagglutination but not through complement activation. *Blood.* 2007; 109: 5355–5362.
9. Baumgarth, N., Tung, J. W., & Herzenberg, L. A. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol.* 2005; 26: 347–362.
10. Beebe, D. P., Schreiber, R. D., & Cooper, N. R. Neutralization of influenza virus by normal human sera: mechanisms involving antibody and complement. *J Immunol.* 1983; 130: 1317–1322.
11. Ben-Aissa-Fennira, F., Ammar-El Gaaied, A. Ben, Bouguerra, A., & Dellagi, K. IgM antibodies to P1 cytoadhesin of *Mycoplasma pneumoniae* are part of the

- natural antibody repertoire expressed early in life. *Immunol Lett.* 1998; 59–62.
12. Benner, R., Hijmans, W., & Haaijman, J. J. The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. *Clin Exp Immunol.* 1981; 46: 1–8.
 13. Berland, R., & Wortis, H. H. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 253–300.
 14. Bernard, P., Vaillant, L., & Labeille, B., et al. Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. *Arch Dermatol.* 1995; 131: 48–52.
 15. Bertram, F., Bröcker, E., Zillikens, D., & Schmidt, E. Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2009; 7: 434–439.
 16. Bieber, K., Koga, H., & Nishie, W. In vitro and in vivo models to investigate the pathomechanisms and novel treatments for pemphigoid diseases. *Exp Dermatol.* 2017; 26: 1163–1170.
 17. Boch, K., Hammers, C. M., & Goletz, S., et al. IgM pemphigoid. *J Am Acad Dermatol.* 2021; 21: 00106–00107.
 18. Boes, M., Esau, C., Fischer, M. B., Schmidt, T., Carroll, M., & Chen, J. Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM. *J Immunol.* 1998; 160: 4776–4787.
 19. Boes, M., Prodeus, A. P., Schmidt, T., Carroll, M. C., & Chen, J. A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *J Exp Med.* 1998; 188: 2381–2386.
 20. Boes, M., Schmidt, T., Linkemann, K., Beaudette, B. C., Marshak-Rothstein, A., & Chen, J. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc Natl Acad Sci.* 2000; 97: 1184–1189.
 21. Bordier-Lamy, F., Eschard, C., & Coste, M., et al. Épidermolyse bulleuse acquise de l'enfant. *Ann Dermatol Venereol.* 2009; 136: 513–517.
 22. Borradori, L., & Sonnenberg, A. Structure and function of hemidesmosomes: More than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol.* 1999; 112: 411–418.
 23. Boulé, M. W., Broughton, C., Mackay, F., Akira, S., Marshak-Rothstein, A., & Rifkin, I. R. Toll-like receptor 9–dependent and–independent dendritic cell activation by chromatin–immunoglobulin G complexes. *J Exp Med.* 2004; 199:

1631–1640.

24. Bradley, J. Immunoglobulins. *J Med Genet.* 1974; 11: 80–90.
25. Braun-Falco, O., Wolff, H. H., & Ponce, E. Disseminated cicatricial pemphigoid. *Hautarzt.* 1981; 32: 233–239.
26. Briggaman, R. A., & Wheeler, C. E. The epidermal dermal junction. *J Invest Dermatol.* 1975; 65: 71–84.
27. Buijsrogge, J. J. A., Diercks, G. F. H., Pas, H. H., & Jonkman, M. F. The many faces of epidermolysis bullosa acquisita after serration pattern analysis by direct immunofluorescence microscopy. *Br J Dermatol.* 2011; 165: 92–98.
28. Casali, P., & Notkins, A. L. CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol Today.* 1989; 10: 364–368.
29. Casali, P., & Schettino, E. W. Structure and function of natural antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; 2010: 167–179.
30. Catellani, S., Pierri, I., Gobbi, M., Poggi, A., & Zocchi, M. R. Imatinib treatment induces CD5+ B lymphocytes and IgM natural antibodies with anti-leukemic reactivity in patients with chronic myelogenous leukemia. *PLoS One.* 2011; 6: 1–9.
31. Chan, O. T. M., Hannum, L. G., Haberman, A. M., Madaio, M. P., & Shlomchik, M. J. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med.* 1999; 189: 1639–1648.
32. Chattopadhyay, M., Rytina, E., Dada, M., Bhogal, B. S., Groves, R., & Handfield-Jones, S. Immunobullous dermatosis associated with Waldenström macroglobulinaemia treated with rituximab. *Clin Exp Immunol.* 2013; 38: 866–869.
33. Chen, M., Chan, L. S., Cai, X., O’Toole, E. A., Sample, J. C., & Woodley, D. T. Development of an ELISA for rapid detection of anti-type VII collagen autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol.* 1997; 108: 68–72.
34. Chen, M., Doostan, A., & Bandyopadhyay, et al. The cartilage matrix protein subdomain of type VII collagen is pathogenic for epidermolysis bullosa acquisita. *Am J Pathol.* 2007; 170: 2009–2018.
35. Chen, M., Kim, G. H., Prakash, L., & Woodley, D. T. Epidermolysis bullosa acquisita: autoimmunity to anchoring fibril collagen. *Autoimmunity.* 2012; 45:

- 91–101.
36. Chen, M., Marinkovich, M. P., Jones, J. C. R., O'Toole, E. A., Li, Y. Y., & Woodley, D. T. NC1 domain of type VII collagen binds to the $\beta 3$ chain of laminin 5 via a unique subdomain within the fibronectin-like repeats. *J Invest Dermatol.* 1999; 112: 177–183.
 37. Chiriac, M. T., Roesler, J., Sindrilaru, A., Scharffetter-Kochanek, K., Zillikens, D., & Sitaru, C. NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *J Pathol.* 2007; 212: 56–65.
 38. Cho, M. J., Ellebrecht, C. T., & Hammers, et al. Determinants of VH1-46 cross-reactivity to pemphigus vulgaris autoantigen desmoglein 3 and rotavirus antigen VP6. *J Immunol.* 2016; 197: 1065–1073.
 39. Choi, S.-C., Wang, H., & Tian, L., et al. Mouse IgM Fc receptor, FCMR, promotes B cell development and modulates antigen-driven immune responses. *J Immunol.* 2013; 190: 987–996.
 40. Choi, Y. S., Dieter, J. A., Rothausler, K., Luo, Z., & Baumgarth, N. B-1 cells in the bone marrow are a significant source of natural IgM. *Eur J Immunol.* 2012; 42: 120–129.
 41. Chou, M.-Y., Fogelstrand, L., & Hartvigsen, K., et al. Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. *J Clin Invest.* 2009; 119: 1335–1349.
 42. Christensen, S. R., Kashgarian, M., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., Akira, S., & Shlomchik, M. J. Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. *J Exp Med.* 2005; 202: 321–331.
 43. Christensen, S. R., Shupe, J., Nickerson, K., Kashgarian, M., Flavell, R. A., & Shlomchik, M. J. Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity.* 2006; 25: 417–428.
 44. Cobb, M. W., Domloge-Hultsch, N., Frame, J. N., & Yancey, K. B. Waldenström Macroglobulinemia With an IgM-? Antiepidermal Basement Membrane Zone Antibody. *Arch Dermatol.* 1992; 128: 372–376.
 45. Coro, E. S., Chang, W. L. W., & Baumgarth, N. Type I IFN receptor signals directly stimulate local B cells early following influenza virus infection. *J Immunol.* 2006; 176: 4343–4351.
 46. Cortés, B., Marazza, G., Naldi, L., Combescure, C., Borradori, L., & Group, A.

- B. D. S. S. Mortality of bullous pemphigoid in Switzerland: a prospective study. *Br J Dermatol.* 2011; 165: 368–374.
47. Czajkowsky, D. M., & Shao, Z. The human IgM pentamer is a mushroom-shaped molecule with a flexural bias. *Proc Natl Acad Sci.* 2009; 106: 14960–14965.
48. Diaz, L. A., Prisyanyh, P. S., & Dasher, D. A., et al. The IgM anti-desmoglein 1 response distinguishes Brazilian pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) from other forms of pemphigus. *J Invest Dermatol.* 2008; 128: 667–675.
49. Duarte-Rey, C., Bogdanos, D. P., Leung, P. S. C., Anaya, J.-M., & Gershwin, M. E. IgM predominance in autoimmune disease: genetics and gender. *Autoimmun Rev.* 2012; 11: A404–A412.
50. Ehlers, M., Fukuyama, H., McGaha, T. L., Aderem, A., & Ravetch, J. V. TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b autoantibodies in SLE. *J Exp Med.* 2006; 203: 553–561.
51. Ehrenstein, M. R., Cook, H. T., & Neuberger, M. S. Deficiency in serum immunoglobulin (Ig) M predisposes to development of IgG autoantibodies. *J Exp Med.* 2000; 191: 1253–1258.
52. Ehrenstein, M. R., & Notley, C. A. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10: 778–786.
53. Ehrenstein, M. R., O’Keefe, T. L., Davies, S. L., & Neuberger, M. S. Targeted gene disruption reveals a role for natural secretory IgM in the maturation of the primary immune response. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95: 10089–10093.
54. Elliott, G. T. Two cases of epidermolysis bullosa. *J Cutan Genitourin Dis.* 1895; 13: 10–18.
55. Engineer, L., & Ahmed, A. R. Emerging treatment for epidermolysis bullosa acquisita. *J Am Acad Dermatol.* 2001; 44: 818–828.
56. Feldmann, M., Brennan, F. M., & Maini, R. N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol.* 1996; 14: 397–440.
57. Fulcher, D. A., Lyons, A. B., & Korn, S. L., et al. The fate of self-reactive B cells depends primarily on the degree of antigen receptor engagement and availability of T cell help. *J Exp Med.* 1996; 183: 2313–2328.
58. Gammon, W. R., Heise, E. R., Burke, W. A., Fine, J.-D., Woodley, D. T., & Briggaman, R. A. Increased frequency of HLA-DR2 in patients with autoantibodies to epidermolysis bullosa acquisita antigen: evidence that the expression of autoimmunity to type VII collagen is HLA class II allele associated.

- J Invest Dermatol.* 1988; 91: 228–232.
59. Gammon, W. R., Murrell, D. F., & Jenison, M. W., et al. Autoantibodies to type VII collagen recognize epitopes in a fibronectin-like region of the noncollagenous (NC1) domain. *J Invest Dermatol.* 1993; 100: 618–622.
60. Gautam, S., & Loh, K.-C. Immunoglobulin-M purification—Challenges and perspectives. *Biotechnol Adv.* 2011; 29: 840–849.
61. Gompel, A., Bletry, O., Wechsler, J., Wechsler, B., Lebon, P., & Godeau, P. Bullous dermatosis associated with dysglobulinemia (two cases). Relationships with epidermolysis bullosa acquisita. *Biomed Pharmacother.* 1982; 36: 199–203.
62. Gong, S., & Ruprecht, R. M. Immunoglobulin M: An Ancient Antiviral Weapon—Rediscovered. *Front Immunol.* 2020; 11: 1–9.
63. Grodzki, A. C., & Berenstein, E. Antibody purification: affinity chromatography—protein A and protein G Sepharose. *Methods Mol Biol.* 2010; 588: 33–41.
64. Grönwall, C., & Silverman, G. J. Natural IgM: beneficial autoantibodies for the control of inflammatory and autoimmune disease. *J Clin Immunol.* 2014; 34: 12–21.
65. Grönwall, C., Vas, J., & Silverman, G. J. Protective roles of natural IgM antibodies. *Front Immunol.* 2012; 3: 1–10.
66. Gupta, R., Woodley, D. T., & Chen, M. Epidermolysis bullosa acquisita. *Clin Dermatol.* 2012; 30: 60–69.
67. Haas, M. S., Alicot, E. M., & Schuerpf, F., et al. Blockade of self-reactive IgM significantly reduces injury in a murine model of acute myocardial infarction. *Cardiovas Res.* 2010; 87: 618–627.
68. Hahn-Ristic, K., Rzany, B., Amagai, M., Bröcker, E., & Zillikens, D. Increased incidence of pemphigus vulgaris in southern Europeans living in Germany compared with native Germans. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2002; 16: 68–71.
69. Hammers, C. M., Bieber, K., & Kalies, K., et al. Complement-fixing anti-type VII collagen antibodies are induced in Th1-polarized lymph nodes of epidermolysis bullosa acquisita-susceptible mice. *J Immunol.* 2011; 187: 5043–5050.
70. Hao, Y., O'Neill, P., Naradikian, M. S., Scholz, J. L., & Cancro, M. P. A B-cell subset uniquely responsive to innate stimuli accumulates in aged mice. *Blood.* 2011; 118: 1294–1304.

71. Hashimoto, T., Ishii, N., Ohata, C., & Furumura, M. Pathogenesis of epidermolysis bullosa acquisita, an autoimmune subepidermal bullous disease. *J Pathol.* 2012; 228: 1–7.
72. Hashimoto, T., Tsuruta, D., & Koga, H., et al. Summary of results of serological tests and diagnoses for 4774 cases of various autoimmune bullous diseases consulted to Kurume University. *Br J Dermatol.* 2016; 175: 953–965.
73. Haury, M., Sundblad, A., Grandien, A., Barreau, C., Coutinho, A., & Nobrega, A. The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. *Eur J Immunol.* 1997; 27: 1557–1563.
74. Hayakawa, K., Asano, M., & Shinton, S. A., et al. Positive selection of natural autoreactive B cells. *Science.* 1999; 285: 113–116.
75. Helm, T. N., & Valenzuela, R. Continuous dermoepidermal junction IgM detected by direct immunofluorescence: a report of nine cases. *J Am Acad Dermatol.* 1992; 26: 203–206.
76. Hibma, M. H., & Griffin, J. F. T. The purification and characterisation of cervine IgM and IgG. *Vet Immunol Immunopathol.* 1990; 26: 343–352.
77. Hirose, M., Brandolini, L., Zimmer, D., Götz, J., & Westermann, J. The allosteric CXCR1/2 inhibitor DF2156A improves experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Genet Syndr Gene Ther.* 2013; 3: 1–9.
78. Hooijkaas, H., van der Linde-Preesman, A. A., Benne, S., & Benner, R. Frequency analysis of the antibody specificity repertoire of mitogen-reactive B cells and “spontaneously” occurring “background” plaque-forming cells in nude mice. *Cell Immunol.* 1985; 92: 154–162.
79. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/General_Information/normalimmunoranges.pdf (Tag des letzten Zugriffs: 06.03.2021).
80. <https://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/immunglobuline/3076> (Tag des letzten Zugriffs: 06.03.2021).
81. Huse, K., Böhme, H.-J., & Scholz, G. H. Purification of antibodies by affinity chromatography. *J Biochem Biophys Methods.* 2002; 51: 217–231.
82. Ishii, N., Hamada, T., & Dainichi, T., et al. Epidermolysis bullosa acquisita: what’s new? *J Dermatol.* 2010; 37: 220–230.
83. Ishii, N., Hashimoto, T., Zillikens, D., & Ludwig, R. J. High-dose intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in autoimmune skin blistering diseases. *Clin*

- Rev Allergy Immunol.* 2010; 38: 186–195.
84. Ishii, N., Yoshida, M., & Hisamatsu, Y., et al. Epidermolysis bullosa acquisita sera react with distinct epitopes on the NC1 and NC2 domains of type VII collagen: study using immunoblotting of domain-specific recombinant proteins and postembedding immunoelectron microscopy. *Br J Dermatol.* 2004; 150: 843–851.
 85. Ishii, N., Yoshida, M., & Ishida-Yamamoto, A., et al. Some epidermolysis bullosa acquisita sera react with epitopes within the triple-helical collagenous domain as indicated by immunoelectron microscopy. *Br J Dermatol.* 2009; 160: 1090–1093.
 86. Johnson, E., Miribel, L., Arnaud, P., & Tsang, K. Y. Purification of IgM monoclonal antibody from murine ascitic fluid by a two-step column chromatography procedure. *Immunol Lett.* 1987; 14: 159–165.
 87. Joly, P., Baricault, S., & Sparsa, A., et al. Incidence and mortality of bullous pemphigoid in France. *J Invest Dermatol.* 2012; 132: 1998–2004.
 88. Jones, E. A. Immunoglobulins and the gut. *Gut.* 1972; 13: 825–835.
 89. Jones, K., Savulescu, A. F., Brombacher, F., & Hadebe, S. Immunoglobulin M in Health and Diseases: How Far Have We Come and What Next? *Front Immunol.* 2020; 11: 1–15.
 90. Junga, M., Kippesb, W., Messer, G., Zillikens, D., & Rzany, B. Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: a population-based study on incidence. *J Am Acad Dermatol.* 1999; 41: 266–268.
 91. Junqueira, L. C. U., Carneiro, J., & Gratzl, M. *Histologie, Kapitel 17: Haut, 305-318* (M. Gratzl (Ed.); 6. Auflage). Springer Medizin Verlag. Heidelberg. 2012.
 92. Kasperkiewicz, M., Nimmerjahn, F., & Wende, S., et al. Genetic identification and functional validation of FcγRIV as key molecule in autoantibody-induced tissue injury. *J Pathol.* 2012; 228: 8–19.
 93. Kasperkiewicz, M., Sadik, C. D., & Bieber, K., et al. Epidermolysis bullosa acquisita: From pathophysiology to novel therapeutic options. *J Invest Dermatol.* 2016; 136: 24–33.
 94. Kasperkiewicz, M., Shimanovich, I., Ludwig, R. J., Rose, C., Zillikens, D., & Schmidt, E. Rituximab for treatment-refractory pemphigus and pemphigoid: a case series of 17 patients. *J Am Acad Dermatol.* 2011; 65: 552–558.
 95. Kasprick, A., Bieber, K., & Ludwig, R. J. Drug discovery for pemphigoid diseases.

- Curr Protoc Pharmacol.* 2019; 84: 1–26.
96. Keyt, B. A., Baliga, R., Sinclair, A. M., Carroll, S. F., & Peterson, M. S. Structure, function, and therapeutic use of igm antibodies. *Antibodies.* 2020; 9: 1–35.
 97. Kim, J. H., & Kim, S. Epidermolysis bullosa acquisita. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013; 27: 1204–1213.
 98. Kim, J. H., Kim, Y. H., & Kim, S.-C. Epidermolysis bullosa acquisita: a retrospective clinical analysis of 30 cases. *Acta Derm Venereol.* 2011; 91: 307–312.
 99. Kim, J. H., Lee, S. E., & KIM, S. Successful treatment of epidermolysis bullosa acquisita with rituximab therapy. *J Dermatol.* 2012; 39: 477–479.
 100. Knutson, V. P., Buck, R. A., & Moreno, R. M. Purification of a murine monoclonal antibody of the IgM class. *J Immunol Methods.* 1991; 136: 151–157.
 101. Koga, H., Prost-Squarcioni, C., Iwata, H., Jonkman, M. F., Ludwig, R. J., & Bieber, K. Epidermolysis Bullosa Acquisita: The 2019 Update. *Front Med.* 2018; 5: 1–28.
 102. Komorowski, L., Müller, R., & Vorobyev, A., et al. Sensitive and specific assays for routine serological diagnosis of epidermolysis bullosa acquisita. *J Am Acad Dermatol.* 2013; 68: e89-95.
 103. Kopecki, Z., & Cowin, A. J. Flightless I: an actin-remodelling protein and an important negative regulator of wound repair. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40: 1415–1419.
 104. Kovacs, B., Tillmann, J., & Freund, L.-C., et al. Fcγ Receptor IIB Controls Skin Inflammation in an Active Model of Epidermolysis Bullosa Acquisita. *Front Immunol.* 2020; 10: 1–15.
 105. Kubagawa, H., Oka, S., & Kubagawa, Y., et al. Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcμR) in humans. *J Exp Med.* 2009; 206: 2779–2793.
 106. Kulik, L., Fleming, S. D., & Moratz, C., et al. Pathogenic natural antibodies recognizing annexin IV are required to develop intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol.* 2009; 182: 5363–5373.
 107. Kuo, T. T., Baker, K., & Yoshida, M., et al. Neonatal Fc receptor: from immunity to therapeutics. *J Clin Immunol.* 2010; 30: 777–789.
 108. Langan, S. M., Smeeth, L., Hubbard, R., Fleming, K. M., Smith, C. J. P., & West, J. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris—incidence and mortality

- in the UK: population based cohort study. *Bmj*. 2008; 337: 160–163.
109. Lapiere, C.-C., Woodley, D. T., & Parente, M. G., et al. Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. *J Clin Invest*. 1993; 92: 1831–1839.
110. Lau, C. M., Broughton, C., & Tabor, A. S., et al. RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J Exp Med*. 2005; 202: 1171–1177.
111. Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., & Tough, D. F. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity*. 2001; 14: 461–470.
112. Leineweber, S., Schönig, S., & Seeger, K. Insight into interactions of the von-Willebrand-factor-A-like domain 2 with the FNIII-like domain 9 of collagen VII by NMR and SPR. *FEBS Lett*. 2011; 585: 1748–1752.
113. Lever, W. F. Pemphigus. *Medicine*. 1953; 32: 1–123.
114. Louis, A. G., & Gupta, S. Primary selective IgM deficiency: an ignored immunodeficiency. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2014; 46: 104–111.
115. Ludwig, R. J. Clinical Presentation, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Epidermolysis Bullosa Acquisita. *ISRN Dermatol*. 2013; 1–25.
116. Lüllmann-Rauch, R. *Histologie, Kapitel 22: Haut und Anhangsgebilde, 519-537* (R. Lüllmann-Rauch (Ed.); 2. Auflage). Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 2003.
117. Ma, S., Wang, C., Mao, X., & Hao, Y. B Cell Dysfunction Associated With Aging and Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2019; 10: 1–7.
118. Magri, G., Comerma, L., & Pybus, M., et al. Human Secretory IgM Emerges from Plasma Cells Clonally Related to Gut Memory B Cells and Targets Highly Diverse Commensals. *Immunity*. 2017; 47: 118-134 e8.
119. Maki, N., Demitsu, T., & Umemoto, N., et al. Possible paraneoplastic syndrome case of bullous pemphigoid with immunoglobulin G anti-BP 180 C-terminal domain antibodies associated with psoriasis and primary macroglobulinemia. *J Dermatol*. 2016; 43: 571–574.
120. Manni, M., Gupta, S., & Ricker, E., et al. Regulation of age-associated B cells by IRF5 in systemic autoimmunity. *Nat Immunology*. 2018; 19: 407–419.
121. Marazza, G., Pham, H. C., & Schäfer, L., et al. Incidence of bullous pemphigoid

- and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study. *Br J Dermatol.* 2009; 161: 861–868.
122. Meffre, E., & Salmon, J. E. Autoantibody selection and production in early human life. *J Clin Invest.* 2007; 117: 598–601.
 123. Mendes, F. B. R., Hissa-Elian, A., Abreu, M. A. M. M. de, & Gonçalves, V. S. Dermatitis herpetiformis. *An Bras Dermatol.* 2013; 88: 594–599.
 124. Merbl, Y., Zucker-Toledano, M., Quintana, F. J., & Cohen, I. R. Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. *J Clin Invest.* 2007; 117: 712–718.
 125. Moll, I. *Dermatologie Duale Reihe, Kapitel 1: Unsere dynamische Haut, 2-15* (I. Moll (Ed.); 6. Auflage). Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 2005.
 126. Morita, E., Horiuchi, K., Yamamoto, S., & Hashimoto, T. A case of acquired autoimmune bullous disease associated with IgM macroglobulinaemia. *J Dermatol.* 1999; 26: 671–676.
 127. Motegi, S., Abe, M., Tamura, A., Ishii, N., Hashimoto, T., & Ishikawa, O. Childhood bullous pemphigoid successfully treated with diaminodiphenyl sulfone. *J Dermatol.* 2005; 32: 809–812.
 128. Munoz, L. E., Lauber, K., Schiller, M., Manfredi, A. A., & Herrmann, M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol.* 2010; 6: 280–289.
 129. Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. *Janeway Immunologie, Kapitel 7: Entwicklung und Überleben von Lymphozyten, 326-345; Kapitel 14: Autoimmunität und Transplantation, 753-761, 774-776* (K. Murphy, P. Travers, & M. Walport (Eds.); 7. Auflage). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Heidelberg. 2009.
 130. Nagaoka, H., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Tsuji, M., & Nussenzweig, M. C. Immunization and infection change the number of recombination activating gene (RAG)-expressing B cells in the periphery by altering immature lymphocyte production. *J Exp Med.* 2000; 191: 2113–2120.
 131. Nethery, A., Raison, R. L., & Easterbrook-Smith, S. B. Single-step purification of immunoglobulin M on C1q-Sepharose. *J Immunol Methods.* 1990; 126: 57–60.
 132. Nevens, J. R., Mallia, A. K., Wendt, M. W., & Smith, P. K. Affinity chromatographic purification of immunoglobulin M antibodies utilizing

- immobilized mannan binding protein. *J Chromatogr.* 1992; 597: 247–256.
133. Nguyen, T. T. T., Elsner, R. A., & Baumgarth, N., et al. Identity of the elusive IgM Fc receptor (Fc μ R) in humans. *J Exp Med.* 2012; 117: 2779–2793.
134. Nickerson, K. M., Christensen, S. R., & Shupe, J., et al. TLR9 regulates TLR7- and MyD88-dependent autoantibody production and disease in a murine model of lupus. *J Immunol.* 2010; 184: 1840–1848.
135. Nieboer, C., Boorsma, D., Woerdeman, M. J., & Kalsbeek, G. L. Epidermolysis bullosa acquisita: immunofluorescence, electron microscopic and immunoelectron microscopic studies in four patients. *Br J Dermatol.* 1980; 102: 383–392.
136. Notley, C. A., Brown, M. A., Wright, G. P., & Ehrenstein, M. R. Natural IgM is required for suppression of inflammatory arthritis by apoptotic cells. *J Immunol.* 2011; 186: 4967–4972.
137. Ochsenbein, A. F., Fehr, T., & Lutz, C., et al. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science.* 1999; 286: 2156–2159.
138. Ogden, C. A., Kowalewski, R., Peng, Y., Montenegro, V., & Elkon, K. B. IGM is required for efficient complement mediated phagocytosis of apoptotic cells in vivo. *Autoimmunity.* 2005; 38: 259–264.
139. Omland, S. H., & Gniadecki, R. IgM-type epidermolysis bullosa acquisita. *Br J Dermatol.* 2015; 173: 1566–1568.
140. Ouchida, R., Mori, H., & Hase, K., et al. Critical role of the IgM Fc receptor in IgM homeostasis, B-cell survival, and humoral immune responses. *Proc Natl Acad Sci.* 2012; 109: E2699-2706.
141. Pak-Leong, L. Isolation of specific IgM monoclonal antibodies by affinity chromatography using alkaline buffers. *Mol Immunol.* 1987; 24: 11–15.
142. Palombo, G., Verdoliva, A., & Fassina, G. Affinity purification of immunoglobulin M using a novel synthetic ligand. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998; 715: 137–145.
143. Pascual, V., Victor, K., & Lelsz, D., et al. Nucleotide sequence analysis of the V regions of two IgM cold agglutinins. Evidence that the VH4-21 gene segment is responsible for the major cross-reactive idiotype. *J Immunol.* 1991; 146: 4385–4391.
144. Ponath, V., & Kaina, B. Death of monocytes through oxidative burst of macrophages and neutrophils: killing in trans. *PLoS One.* 2017; 12: 1–20.

145. Quartier, P., Potter, P. K., Ehrenstein, M. R., Walport, M. J., & Botto, M. Predominant role of IgM-dependent activation of the classical pathway in the clearance of dying cells by murine bone marrow-derived macrophages in vitro. *Eur J Immunol.* 2005; 35: 252–260.
146. Radic, M. Z., & Weigert, M. Genetic and structural evidence for antigen selection of anti-DNA antibodies. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12: 487–520.
147. Recke, A., Sitaru, C., & Vidarsson, G., et al. Pathogenicity of IgG subclass autoantibodies to type VII collagen: Induction of dermal–epidermal separation. *J Autoimmun.* 2010; 34: 435–444.
148. Rink, L., Kruse, A., & Haase, H. *Immunologie für Einsteiger, Kapitel 2: Die lymphatischen Organe: Blutbildung und Konferenzzentren, 19-37; Kapitel 5: Die Immunantwort durch Lymphozyten, 78-104; Kapitel 9: Autoimmunität, 169-183* (L. Rink, A. Kruse, & H. Haase (Eds.); 1. Auflage). Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. 2012.
149. Roenigk, H. H., Ryan, J. G., & Bergfeld, W. F. Epidermolysis bullosa acquisita: report of three cases and review of all published cases. *Arch Dermatol.* 1971; 103: 1–10.
150. Rojas, R., & Apodaca, G. Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3: 944–956.
151. Sadeghi, H., Lockmann, A., & Hund, A.-C., et al. Caspase-1–Independent IL-1 Release Mediates Blister Formation in Autoantibody-Induced Tissue Injury through Modulation of Endothelial Adhesion Molecules. *J Immunol.* 2015; 194: 3656–3663.
152. Sakai, L. Y., Keene, D. R., Morris, N. P., & Burgeson, R. E. Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J Cell Biol.* 1986; 103: 1577–1586.
153. Saleh, M. A., Ishii, K., & Kim, Y.-J., et al. Development of NC1 and NC2 domains of type VII collagen ELISA for the diagnosis and analysis of the time course of epidermolysis bullosa acquisita patients. *J Dermatol Sci.* 2011; 62: 169–175.
154. Samavedam, U. K. S. R. L., Iwata, H., & Müller, S., et al. GM-CSF modulates autoantibody production and skin blistering in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Immunol.* 2014; 192: 559–571.
155. Samavedam, U. K. S. R. L., Kalies, K., & Scheller, J., et al. Recombinant IL-6

- treatment protects mice from organ specific autoimmune disease by IL-6 classical signalling-dependent IL-1ra induction. *J Autoimmun.* 2013; 40: 74–85.
156. Schmidt, E., Benoit, S., Bröcker, E. B., Zillikens, D., & Goebeler, M. Successful adjuvant treatment of recalcitrant epidermolysis bullosa acquisita with anti-CD20 antibody rituximab. *Arch Dermatol.* 2006; 142: 147–150.
157. Schmidt, E., & Eming, R. Bullöse Autoimmundermatosen. *Hautarzt.* 2019; 70: 234–235.
158. Schmidt, E., Kasperkiewicz, M., & Joly, P. Pemphigus. *Lancet.* 2019; 394: 882–894.
159. Schmidt, E., & Zillikens, D. Diagnostik und Therapie bullöser autoimmundermatosen. *Dtsch Ärztebl.* 2011; 108: 399–405.
160. Schmidt, E., & Zillikens, D. Pemphigoid diseases. *Lancet.* 2013; 381: 320–332.
161. Schneider, P. The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol.* 2005; 17: 282–289.
162. Shibuya, N., Berry, J. E., & Goldstein, I. J. One-step purification of murine IgM and human α 2-macroglobulin by affinity chromatography on immobilized snowdrop bulb lectin. *Arch Biochem Biophys.* 1988; 267: 676–680.
163. Shima, H., Takatsu, H., & Fukuda, S., et al. Identification of TOSO/FAIM3 as an Fc receptor for IgM. *Int Immunol.* 2010; 22: 149–156.
164. Shlomchik, M. J. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity.* 2008; 28: 18–28.
165. Silverman, G. J., Srikrishnan, R., & Germar, K., et al. Genetic imprinting of autoantibody repertoires in systemic lupus erythematosus patients. *Clin Exp Immunol.* 2008; 153: 102–116.
166. Sitaru, C., & Zillikens, D. Mechanisms of blister induction by autoantibodies. *Exp Dermatol.* 2005; 14: 861–875.
167. Smith, J. A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol.* 1994; 56: 672–686.
168. Stahl, D., Lacroix-Desmazes, S., Barreau, C., Sibrowski, W., Kazatchkine, M. D., & Kaveri, S. V. Altered antibody repertoires of plasma IgM and IgG toward nonself antigens in patients with warm autoimmune hemolytic anemia. *Hum Immunol.* 2001; 62: 348–361.
169. Stanley, J. R. Autoantibodies against adhesion molecules and structures in blistering skin diseases. *J Exp Med.* 1995; 181: 1–4.

170. Stüssel, P., Dieckhoff, K. S., & Künzel, S., et al. Propranolol is an effective topical and systemic treatment option for experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol.* 2020; 140: 2408–2420.
171. Suchniak, J. M., Diaz, L. A., Lin, M.-S., & Fairley, J. A. IgM-mediated epidermolysis bullosa acquisita. *Arch Dermatol.* 2002; 138: 1385–1386.
172. Taborda, C. P., & Casadevall, A. CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Immunity.* 2002; 16: 791–802.
173. Tazudeen, N., Au, S., Pewitt, J., Tu, E., & Aronson, I. K. IgM ocular cicatricial pemphigoid: a unique insight into the immune system. *Dermatol Online J.* 2015; 21: 13030.
174. Terra, J. B., Meijer, J. M., Jonkman, M. F., & Diercks, G. F. H. The n-vs. u-serration is a learnable criterion to differentiate pemphigoid from epidermolysis bullosa acquisita in direct immunofluorescence serration pattern analysis. *Br J Dermatol.* 2013; 169: 100–105.
175. Terra, J. B., Pas, H. H., Hertl, M., Dikkers, F. G., Kamminga, N., & Jonkman, M. F. Immunofluorescence serration pattern analysis as a diagnostic criterion in antilaminin-332 mucous membrane pemphigoid: immunopathological findings and clinical experience in 10 Dutch patients. *Br J Dermatol.* 2011; 165: 815–822.
176. Tsunoda, K., Ota, T., & Saito, M., et al. Pathogenic relevance of IgG and IgM antibodies against desmoglein 3 in blister formation in pemphigus vulgaris. *Am J Pathol.* 2011; 179: 795–806.
177. Ueda, Y., Yang, K., Foster, S. J., Kondo, M., & Kelsoe, G. Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *J Exp Med.* 2004; 199: 47–58.
178. Van Oudenaren, A., Haaijman, J. J., & Benner, R. Frequencies of background cytoplasmic Ig-containing cells in various lymphoid organs of athymic and euthymic mice as a function of age and immune status. *Immunology.* 1984; 51: 735–742.
179. Vas, J., Grönwall, C., Marshak-Rothstein, A., & Silverman, G. J. Natural antibody to apoptotic cell membranes inhibits the proinflammatory properties of lupus autoantibody immune complexes. *Arthritis Rheum.* 2012; 64: 3388–3398.
180. Velthuis, P. J., De Jong, M., & Kruis, M. H. Is There a Linear IgM Dermatitis?

- Significance of linear IgM junctional staining in cutaneous immunopathology. *Acta Derm Venereol.* 1988; 68: 8–14.
181. Viglianti, G. A., Lau, C. M., Hanley, T. M., Miko, B. A., Shlomchik, M. J., & Marshak-Rothstein, A. Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity.* 2003; 19: 837–847.
182. Vodegel, R. M., de Jong, M. C. J. M., Pas, H. H., & Jonkman, M. F. IgA-mediated epidermolysis bullosa acquisita: two cases and review of the literature. *J Am Acad Dermatol.* 2002; 47: 919–925.
183. Vodegel, R. M., Jonkman, M. F., Pas, H. H., & De Jong, M. U-serrated immunodeposition pattern differentiates type VII collagen targeting bullous diseases from other subepidermal bullous autoimmune diseases. *Br J Dermatol.* 2004; 151: 112–118.
184. Vollmers, H. P., & Brändlein, S. Natural IgM antibodies: the orphaned molecules in immune surveillance. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006; 58: 755–765.
185. Waisbourd-Zinman, O., Ben-Amitai, D., & Cohen, et al. Bullous pemphigoid in infancy: Clinical and epidemiologic characteristics. *J Am Acad Dermatol.* 2008; 58: 41–48.
186. Wang, H., & Shlomchik, M. J. Maternal Ig mediates neonatal tolerance in rheumatoid factor transgenic mice but tolerance breaks down in adult mice. *J Immunol.* 1998; 160: 2263–2271.
187. Wei, C., Anolik, J., & Cappione, A., et al. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2007; 178: 6624–6633.
188. Wesemann, D. R., Portuguese, A. J., & Meyers, R. M., et al. Microbial colonization influences early B-lineage development in the gut lamina propria. *Nature.* 2013; 501: 112–115.
189. West, N. Y., Fitzpatrick, J. E., David-Bajar, K. M., & Bennion, S. D. Waldenström macroglobulinemia–induced bullous dermatosis. *Arch Dermatol.* 1998; 134: 1127–1131.
190. Whittaker, S. J., Bhogal, B. S., & Black, M. M. Acquired immunobullous disease: a cutaneous manifestation of IgM macroglobulinaemia. *Br J Dermatol.* 1996; 135: 283–286.
191. Wichman, A., & Borg, H. Purification of human immunoglobulin M by affinity

- chromatography on protamine-Sepharose. *Biochim Biophys Acta*. 1977; 490: 363–369.
192. Witte, T. IgM antibodies against dsDNA in SLE. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2008; 34: 345–347.
193. Woodley, D. T., Briggaman, R. A., O’Keefe, E. J., Inman, A. O., Queen, L. L., & Gammon, W. R. Identification of the skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. *N Engl J Med*. 1984; 310: 1007–1013.
194. Woodley, D. T., Burgeson, R. E., Lunstrum, G., Bruckner-Tuderman, L., Reese, M. J., & Briggaman, R. A. Epidermolysis bullosa acquisita antigen is the globular carboxyl terminus of type VII procollagen. *J Clin Invest*. 1988; 81: 683–687.
195. Wuepper, K. D. Bullous pemphigoid due to a 19S monoclonal paraprotein in patient with Waldenstrom’s macroglobulinemia. *J Clin Res*. 1978; 26: 579A.
196. Xander, P., Vigna, A. F., & dos Santos Feitosa, L., et al. A surface 75-kDa protein with acid phosphatase activity recognized by monoclonal antibodies that inhibit *Paracoccidioides brasiliensis* growth. *Microbes Infect*. 2007; 9: 1484–1492.
197. Xu, H., & Roberts-Thomson, P. J. Circulating low molecular weight IgM—A disease marker in autoimmune, infective, immunodeficient and B cell lymphoproliferative disorders. *Dis Markers*. 1992; 10: 115–141.
198. Zillikens, D., & Giudice, G. J. BP180/type XVII collagen: its role in acquired and inherited disorders or the dermal-epidermal junction. *Arch Dermatol Res*. 1999; 291: 187–194.
199. Zurn, A., Celebi, C. R., Bernard, P., Didierjean, L., & Saurat, J. A prospective immunofluorescence study of 111 cases of pruritic dermatoses of pregnancy: IgM anti-basement membrane zone antibodies as a novel finding. *Br J Dermatol*. 1992; 126: 474–478.

7. Anhänge

7.1. Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren



Schleswig-Holstein
Der echte Norden



Schleswig-Holstein
Ministerium für Energie-
wende, Landwirtschaft,
Umwelt und ländliche Räume

Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt
und ländliche Räume | Postfach 71 51 | 24171 Kiel

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

Ihr Zeichen:
Ihre Antrag vom: 24.07.2015
Mein Zeichen: V 242 - 71168/2015 (98-7/15)
Meine Nachricht vom: /

Anja Hinz
Anja.Hinz@melur.landsh.de
+49 431 988-7128
+49-431-988-6-157128

nachrichtlich:
Herrn Dr. B. Schmelting
Gemeinsame Tierhaltung
der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23562 Lübeck

14. Oktober 2015

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrte Frau Dr. Bieber,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch Gesetz vom 28. Juli 2014 (BGBl. I S. 1308), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

Vergleichende Evaluierung von Entzündungsmarkern und Entzündungsmechanismen bei Antikörpertransfer- und Immunisierungs-induzierter Epidermolysis bullosa acquisita

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 273 Mäuse verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Oktober 2018 befristet.
3. Ort der Durchführung:
Universität zu Lübeck, Gemeinsame Tierhaltung

Dienstgebäude: Mercatorstraße 3, 5, 7, 24106 Kiel | Adolf-Westphal-Str. 4, 24143 Kiel | Telefon 0431 988-0 | Telefax 0431 988-7239 |
poststelle@melur.landsh.de | www.melur.schleswig-holstein.de | E-Mail-Adressen: Kein Zugang für elektronisch verschlüsselte
Dokumente.

4. Leiterin des Versuchsvorhabens:
Frau Dr. Katja Bieber
5. Stellvertreter:
Herr Prof. Dr. Ralf Ludwig
6. Wechselt die Leiterin des Versuchsvorhabens oder ihr Stellvertreter, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
7. Verantwortlicher Tierarzt nach § 28 der Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125):
Herr Dr. B. Schmelting
8. Weitere Nebenbestimmungen:
Keine.

Die im Antrag gemachten Angaben sind Bestandteil dieser Genehmigung. Sofern vorstehend abweichende Nebenbestimmungen getroffen wurden, gehen diese den Angaben im Antrag vor.

Die Bestimmungen des § 8 des Tierschutzgesetzes, der Tierschutz-Versuchstierverordnung sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVOBl. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten. Ich weise insbesondere darauf hin, dass Tierversuche nur durch den in § 16 der Tierschutz-Versuchstierverordnung genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Klage bei dem Schleswig-Holsteinischen Verwaltungsgericht, Brockdorff-Rantzaus-Straße 13, 24837 Schleswig, schriftlich, in elektronischer Form oder zur Niederschrift der/des Urkundsbeamtin/Urkundsbeamten der Geschäftsstelle erhoben werden.

Hinweis:

Bei der Verwendung der elektronischen Form sind besondere Voraussetzungen zu beachten (vgl. die Landesverordnung über den elektronischen Rechtsverkehr mit den Gerichten und Staatsanwaltschaften vom 12.12.2006 (GVOBl. 2006, 361) in der z. Zt. geltenden Fassung. *Hiernach wird die elektronische Form insbesondere durch eine qualifiziert signierte Datei gewahrt, die nach den Maßgaben der genannten Landesverordnung übermittelt wird. Weitere Informationen zum elektronischen Rechtsverkehr mit den Gerichten und Staatsanwaltschaften sind auf der Internetseite www.justizpoststelle.schleswig-holstein.de abrufbar.*

Mit freundlichen Grüßen



Dr. Bähr

Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt
und ländliche Räume | Postfach 71 51 | 24171 Kiel

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

Ihr Zeichen:
Ihr Antrag vom: 04.11.2015
Mein Zeichen: V 242 - 81794/2015 (6-1/16)
Meine Nachricht vom: /

Anja Hinz
Anja.Hinz@melur.landsh.de
Telefon: +49 431 988-7128
Telefax: +49-431-988-6-157128

nachrichtlich:
Herrn Dr. B. Schmelting
Gemeinsame Tierhaltung
der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23562 Lübeck

28. Januar 2016

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrte Frau Dr. Bieber,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch Gesetz vom 28. Juli 2014 (BGBl. I S. 1308), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

Testung von rekombinanten mCOL7 Proteinen zur Induktion einer experimentellen EBA zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 102 Mäuse verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Januar 2019 befristet.
3. Ort der Durchführung:
Universität zu Lübeck, Gemeinsame Tierhaltung

4. Leiterin des Versuchsvorhabens:
Frau Dr. Katja Bieber
5. Stellvertreter:
Herr Prof. Dr. Ralf Ludwig
6. Wechselt die Leiterin des Versuchsvorhabens oder ihr Stellvertreter, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
7. Verantwortlicher Tierarzt nach § 28 der Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125):
Herr Dr. B. Schmelting
8. Weitere Nebenbestimmungen:
Keine.

Die im Antrag gemachten Angaben sind Bestandteil dieser Genehmigung. Sofern vorstehend abweichende Nebenbestimmungen getroffen wurden, gehen diese den Angaben im Antrag vor.

Die Bestimmungen des § 8 des Tierschutzgesetzes, der Tierschutz-Versuchstierverordnung sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVOBl. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten. Ich weise insbesondere darauf hin, dass Tierversuche nur durch den in § 16 der Tierschutz-Versuchstierverordnung genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Klage bei dem Schleswig-Holsteinischen Verwaltungsgericht, Brockdorff-Rantzau-Straße 13, 24837 Schleswig, schriftlich, in elektronischer Form oder zur Niederschrift der/des Urkundsbeamtin/Urkundsbeamten der Geschäftsstelle erhoben werden.

Hinweis:

Bei der Verwendung der elektronischen Form sind besondere Voraussetzungen zu beachten (vgl. die Landesverordnung über den elektronischen Rechtsverkehr mit den Gerichten und Staatsanwaltschaften vom 12.12.2006 (GVOBl. 2006, 361) in der z. Zt. geltenden Fassung. *Hiernach wird die elektronische Form insbesondere durch eine qualifiziert signierte Datei gewahrt, die nach den Maßgaben der genannten Landesverordnung übermittelt wird. Weitere Informationen zum elektronischen Rechtsverkehr mit den Gerichten und Staatsanwaltschaften sind auf der Internetseite www.justizpoststelle.schleswig-holstein.de abrufbar.*

Mit freundlichen Grüßen


Dr. Sekulla

8. Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe, dass ich keine anderen als die angegebenen personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel verwendet habe und dass ich Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut und Sinn nach entnommen wurden, unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich niemals zuvor und auch nicht gleichzeitig andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder die Dissertation vorgelegt habe. Ich habe mich bisher keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen.

Rebecca Gembicki

Lübeck, den 16.09.2021

9. Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

Zunächst möchte ich dem Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED) der Universität zu Lübeck, insbesondere der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ludwig sowie dem Direktor der hiesigen Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, Herrn Prof. Dr. med. Detlef Zillikens, für die Bereitstellung der Laborräume und sämtlicher Materialien zur Durchführung meiner experimentellen Doktorarbeit danken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ludwig, der mir das interessante Thema meiner Doktorarbeit überlies, sowie bei meiner Doktormutter Frau PD Dr. rer. physiol. Katja Bieber, die mich über das gesamte Projekt hervorragend betreute und stets eine überaus kompetente Ansprechpartnerin war. Allzeit stand sie für Fragen bereit, begeisterte und motivierte mich stets durch das große Engagement und die Freude an ihrer Arbeit. Beide habe ich bereits während meiner jahrelangen beruflichen Tätigkeit in der AG Ludwig kennen und schätzen gelernt.

Ich möchte mich herzlich bei allen MitarbeiterInnen aus Haus 10 sowie den Mitgliedern des LIEDs für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor und die stetige Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung bedanken, besonders hervorben möchte ich Claudia Kauderer, Astrid Fischer, Daniela Rieck, Vanessa Krull, Dr. rer. nat. Saeedeh Ghorbanalipoor und Dr. rer. nat. Stefanie Goletz. Außerdem möchte ich mich bei Annika Munko und Georg Kaiser für den hilfreichen Informationsaustausch von Erfahrungen bei den Experimenten bedanken.

Zuletzt danke ich meiner gesamten Familie und meinen Freunden für die Unterstützung, die ich nicht nur im Rahmen dieser Doktorarbeit, sondern bereits auf meinem bisherigen Lebensweg erfahren durfte. Mein allergrößter Dank gilt hierbei vor allem meinem Mann sowie meinen Eltern und meiner Schwester, die es mir ermöglichten, diese Doktorarbeit neben Kind und Berufsalltag fertigzustellen. Ohne euren Rückhalt, eure Geduld, ununterbrochene Unterstützung und Zuversicht sowie die liebevollen aufmunternden Worte wäre dieses kaum möglich gewesen. Ihr seid immer für mich da: Danke, dass es euch gibt!

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Gembicki, geb. Cames
Vorname: Rebecca
Geburtsdatum: 17.04.1986
Geburtsort: Eutin



Schulbildung

08/1996 – 06/2005 Ernestinenschule zu Lübeck, Abitur

Hochschulstudium

11/2018 Approbation als Ärztin
10/2012 – 11/2018 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck

Praktisches Jahr

11/2017 - 03/2018 Institut für Humangenetik, Ambulanzzentrum des UKSH gGmbH,
Genetisches MVZ, Lübeck/Kiel, Campus Lübeck
03/2017 - 06/2017 Innere Medizin, Sana Kliniken Lübeck
06/2018 - 08/2018 Klinik für Kinderchirurgie, UKSH, Campus Lübeck
08/2018 - 10/2018 Klinik für Chirurgie, UKSH, Campus Lübeck

Beruflicher Werdegang

Seit 01/2019 Assistenzärztin im Institut für Humangenetik, Ambulanzzentrum des UKSH
gGmbH, Genetisches MVZ Lübeck/Kiel, Campus Lübeck
01/2009 - 12/2017 MTLA, Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie, UKSH, Campus
Lübeck
12/2009 Geprüfte Fremdsprachenkorrespondentin, Fremdsprache Englisch,
Industrie- und Handelskammer zu Lübeck
10/2008 - 09/2009 Ausbildung zu Fremdsprachenkorrespondentin, Fremdsprache Englisch,
Inlingua Sprachschule, Lübeck
09/2008 Staatlich geprüfte medizinisch-technisch Laboratoriumsassistentin (MTLA),
Landesamt für soziale Dienste Schleswig-Holstein
09/2005 - 09/2008 MTLA-Schule im Bildungszentrum für Gesundheitsfachberufe, UKSH,
Campus Lübeck

Zeitraum der Dissertation

09/2021: Fertigstellung der Dissertation
10/2015: Beginn der Promotionsschrift am Lübecker Institut für Experimentelle
Dermatologie, UKSH, Campus Lübeck unter PD Dr. rer. physiol. Katja
Bieber

Publikationen

Tukaj S., Bieber K., Kleszczyński K., Witte M., Cames R., Kalies K., Zillikens D., Ludwig R. J., Fischer
T. W., Kasperkiewicz M.: Topically Applied Hsp90 Blocker 17AAG Inhibits Autoantibody-Mediated
Blister-Inducing Cutaneous Inflammation. J Invest Dermatol 2017 Feb;137(2):341-349.