

**Untersuchungen HLA-Klasse II-assoziierter, T-zellvermittelter
Autoimmunität im humanisierten *SCID*-Mausmodell des
*Pemphigus vulgaris***

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Thomas Rädisch
aus
Aachen

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Michael Hertl

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Hans F. Merk

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juli 2003

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Wesentliche Teile der hier vorgelegten Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht und auf den folgenden Kongressen vorgestellt:

Rädisch T, Riechers R, Hertl M. (2002) The humanized *SCID* mouse model to study HLA class II-linked autoimmunity to desmoglein 3 in pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 146: 189-193

12th European Students Conference, Charité Berlin, November 2001: The humanized *SCID* mouse model – a possible *in vivo* model for pemphigus vulgaris?
Verleihung des “Zondek Award For Best Oral Presentation”

27. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Wien, Februar 2000: The humanized *SCID* mouse model to study HLA class II-linked autoimmunity to desmoglein 3 in pemphigus vulgaris. Abstractveröffentlichung in *Arch Dermatol Res* (2000) 292, 2/3: 145

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem und seine Entwicklung	5
1.1.1 Funktionen der Lymphozyten	7
1.1.1.1 Die zelluläre Immunität	7
1.1.1.2 Die humorale Immunität	8
1.2 Autoimmunerkrankungen	9
1.2.1 Bullöse Autoimmundermatosen.....	10
1.2.1.1 Aufbau der Haut	11
1.2.2 Pemphigus vulgaris	12
1.3 Die SCID-Maus als <i>in vivo</i> -Modell humaner Autoimmunerkrankungen	17
1.3.1 Rekonstitution der SCID-Maus mit menschlichen Lymphozyten.....	18
1.3.1.1 Die SCID-Maus in der autoimmunologischen Forschung	19
1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit	20

2 Material und Methoden

2.1 Produktion und Aufreinigung des rekombinanten DG3	21
2.1.1 Das Baculovirus-Expressionssystem	21
2.1.1.1 Insektenzellen und Kulturmedien	22
2.1.1.2 Virusamplifikation	22
2.1.1.3 Produktion von rekombinantem DG3	23
2.1.2 Lebendzellfärbung mit Trypanblau und Bestimmung der Zellzahl	23
2.1.3 Nachweis von rekombinantem DG3	24
2.1.3.1 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	24
2.1.3.2 Western Blot	24
2.1.4 Proteinaufreinigung	25
2.1.4.1 Lyse von Insektenzellen	25
2.1.4.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung	25
2.1.4.3 Proteinbestimmung nach Lowry	27
2.2 Humane Lymphozyten	27
2.2.1 Separierung humaner Lymphozyten	27
2.2.2 Vorbereitung der Zellen für die i.p.-Injektion.....	28
2.3 SCID-Mäuse	28
2.3.1 Haltungsbedingungen	29
2.3.2 Intraperitoneale Injektion menschlicher mononukleärer Zellen	29
2.3.3 Boosterung der Mäuse	29
2.3.4 Blutentnahme	30
2.3.4.1 Punktion des retroorbitalen Venenplexus	30
2.3.4.2 Herzpunktion.....	30
2.3.5 Organentnahme	30
2.4 Untersuchungen an Blut- und Gewebeproben der SCID-Mäuse	31
2.4.1 ELISA zum Nachweis von murinen und humanen Immunglobulinen.....	31
2.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)	32
2.4.3 Direkte Immunfluoreszenz (DIF)	33

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis des rekombinanten DG3	34
3.2 Nachweis von murinem Immunglobulin im Mausserum („Leaky“-Test)	34
3.3 Nachweis von humanem Immunglobulin in Mausseren mittels ELISA	35
3.4 Nachweis humaner antidesmosomaler Antikörper im Mausserum mittels indirekter Immunfluoreszenz	38
3.5 Nachweis gewebegebundener humaner Autoantikörper in <i>SCID</i> -Mäusen nach PBL- Injektion	39

4 Diskussion

4.1 Pemphigus vulgaris und bisherige Therapieoptionen	40
4.2 Neue Therapieansätze und Notwendigkeit eines <i>in vivo</i> -Modells	41
4.2.1 Das humanisierte <i>SCID</i> -Mausmodell	42
4.2.2 Andere Ansätze zur Etablierung eines <i>in vivo</i> -Modells	45
4.3 Ausblick	47

5 Zusammenfassung48

Anhang	49
--------------	----

Literaturverzeichnis	55
----------------------------	----

Danksagung	63
------------------	----

Lebenslauf	64
------------------	----

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem und seine Entwicklung

Um sich vor der Bedrohung durch pathogene Umweltfaktoren (Mikroorganismen und Viren) zu schützen, haben höhere Organismen einschließlich des Menschen einen komplexen Schutzmechanismus, das Immunsystem (lat. *immunis*, frei) entwickelt. Krankheitserreger, denen es gelingt, die physikalische Barriere der Haut und der Schleimhäute zu durchbrechen, werden auf diese Weise als fremd erkannt und zerstört.

Für die spezifische Immunität bei Wirbeltieren sind weiße Blutkörperchen verantwortlich, die man zusammenfassend als Lymphozyten bezeichnet. Die Lymphozyten treten vor allem in vier Kompartimenten des Organismus auf - im Knochenmark, im Thymus, in den peripheren lymphatischen Organen und in den Schleimhäuten sowie im Blut und in der Lymphflüssigkeit.

Wie alle Blutzellen entstehen sie aus gemeinsamen Vorläuferzellen, den hämatopoetischen Stammzellen, im Knochenmark und reifen zu Effektorzellen, die für die zelluläre und humorale Immunität verantwortlich sind. T-Lymphozytenvorläufer wandern zum Thymus, ein lymphatisches Organ im oberen Brustbereich, reifen dort heran und bilden ihre Antigenpezifität aus. B-Lymphozyten hingegen differenzieren sich im Knochenmark. Ausgereifte, antigenspezifische Lymphozyten wandern von diesen Geweben über das Blut in die peripheren lymphatischen Organe, Lymphknoten, Milz und darmassoziierte lymphatische Gewebe.

Die Lymphozyten zeigen morphologisch im Licht- und Elektronenmikroskop große Ähnlichkeit, weisen jedoch unterschiedliche Glyko- oder Rezeptorproteine an der Zelloberfläche auf. B-Lymphozyten differenzieren zu Plasmazellen, die Antikörper (AK) sezernieren. T-Lymphozyten zeigen eine dichotome Entwicklung, indem sie sich entweder zu Effektorzellen differenzieren, die direkt zytotoxisch sind oder andere Zellen des Immunsystems wie Makrophagen und B-Zellen aktivieren. Diese Entwicklung der Lymphozyten ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt (Janeway 2001, Voet 1999).

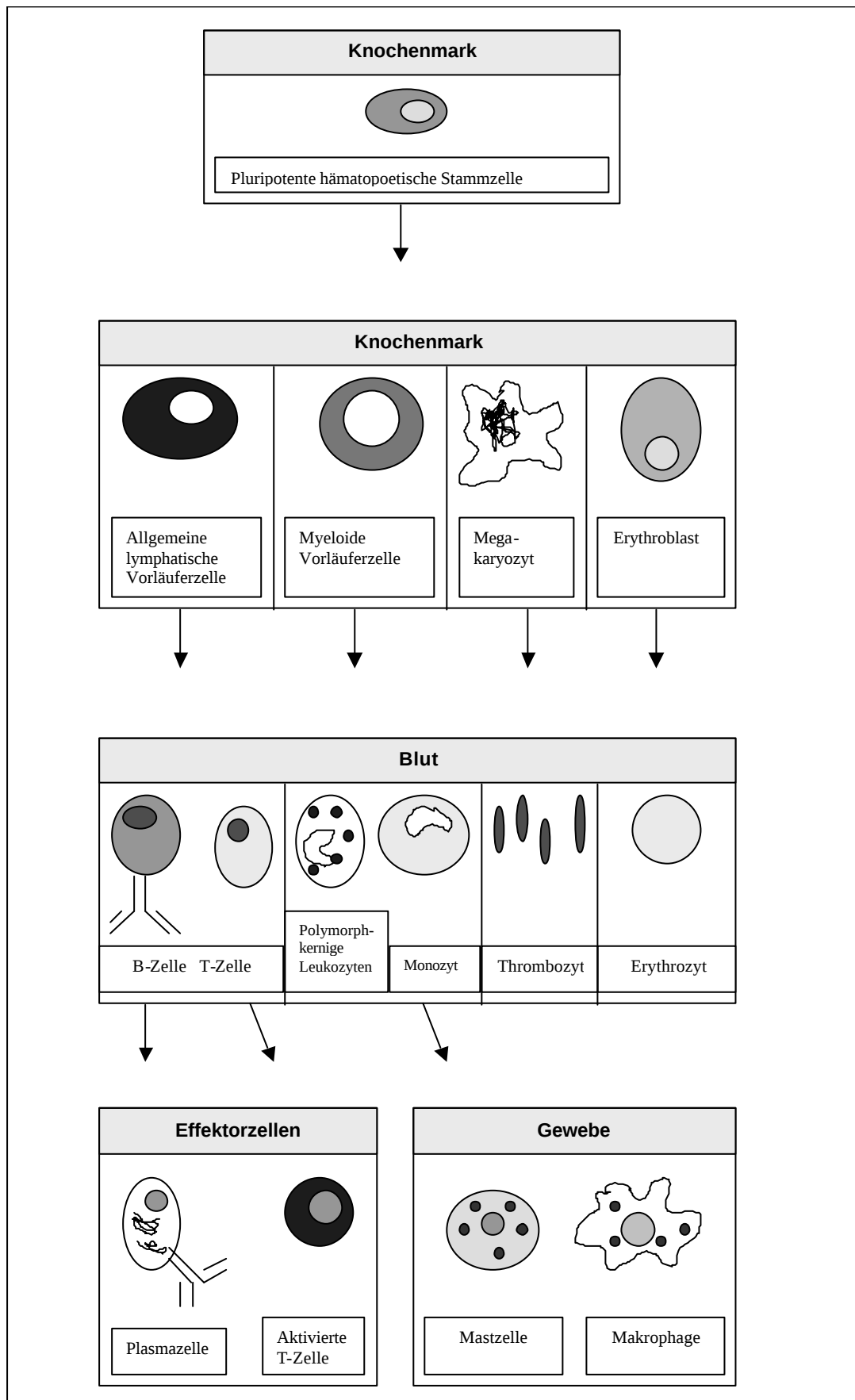


Abb. 1.1: Differenzierungsschritte der Effektorzellen angeborener und erworbener Immunität

1.1.1 Funktionen der Lymphozyten

Lymphozyten sind Mediatoren der spezifischen immunologischen Erkennung von Pathogenen und leiten erworbene Immunantworten ein. B-Zellen sind die Effektorzellen der humoralen Immunität. Sie erkennen ihr spezifisches Antigen (AG) durch Bindung an ein membranständiges Rezeptormolekül (Immunglobulin). Nachdem die B-Zelle ihr spezifisches Antigen erkannt hat, teilt sie sich und differenziert zur Plasmazelle. Diese produziert große Mengen des Rezeptormoleküls (Immunglobulin) in löslicher Form, so dass es sezerniert werden kann. Diese Antikörpermoleküle sind große Glykoproteine, die im Blut, in Gewebeflüssigkeiten und in gewebegebundener Form vorkommen. Sie binden spezifisch an ihr spezifisches Antigen, durch das die B-Zelle zuvor spezifisch aktiviert wurde. Die Bindung von Antigenen durch Antikörper stimuliert, zum Beispiel durch Komplementaktivierung, andere Teile des Immunsystems, welches dann das Pathogen, das dieses Antigen trägt, eliminiert.

T-Lymphozyten haben verschiedene biologische Funktionen. Die Gruppe der T-Helferzellen (T_H) weist zwei Hauptfunktionen auf. Eine Gruppe interagiert mit B-Zellen und hilft diesen, sich zu teilen, zu differenzieren und Antikörper zu produzieren (T_H2). Eine andere Gruppe wirkt auf die mononukleären Makrophagen ein und hilft ihnen, Pathogene zu zerstören (T_H1). Eine weitere Gruppe von T-Zellen ist verantwortlich für die direkte Zerstörung von Wirtszellen, die von Viren oder anderen intrazellulären Pathogenen befallen sind - diese Wirkungsweise nennt man Zytotoxizität und diese T-Zellen folglich zytotoxische T-Zellen (T_C). T-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen in Verbindung mit vertrauten Glykoproteinen auf der antigenpräsentierenden Zelle (APC), dem sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC). T-Zellen besitzen einen antigenspezifischen Immunglobulinrezeptor, den T-Zellrezeptor (TCR). Dieser ist funktionell und strukturell mit dem Oberflächenantikörper verwandt, den B-Zellen als ihren Antigenrezeptor verwenden. T-Zellen erzeugen ihre Wirkungen entweder durch Freisetzen löslicher Proteine, sogenannter Zytokine, oder durch direkte Zell-Zell-Interaktionen (Janeway 2001).

1.1.1.1 Die zelluläre Immunität

Die zelluläre Immunität richtet sich gegen virusinfizierte Zellen, pathogene Mikroorganismen und körperfremde Proteine. Sie wird durch T-Zellen vermittelt. Zu Beginn der zellulären Immunantwort nimmt eine antigenpräsentierende Zelle (dendritische Zelle, Monozyt, Makrophage etc.) das fremde Antigen auf und baut es in seinen intrazellulären Lysosomen

teilweise ab. Die dabei entstehenden Antigenfragmente präsentiert die APC zusammen mit MHC-Proteinen an ihrer Oberfläche. Körperfremde Antigene werden durch den endozytotischen Abbauweg in Assoziation mit MHC-Molekülen der Klasse II CD4-positiven T-Zellen präsentiert (Abb. 2). Dagegen werden körpereigene Proteine oder virusinfizierte bzw. neoplastische körpereigene Zellproteine in Verbindung mit MHC I-Molekülen CD8-positiven T-Zellen präsentiert.

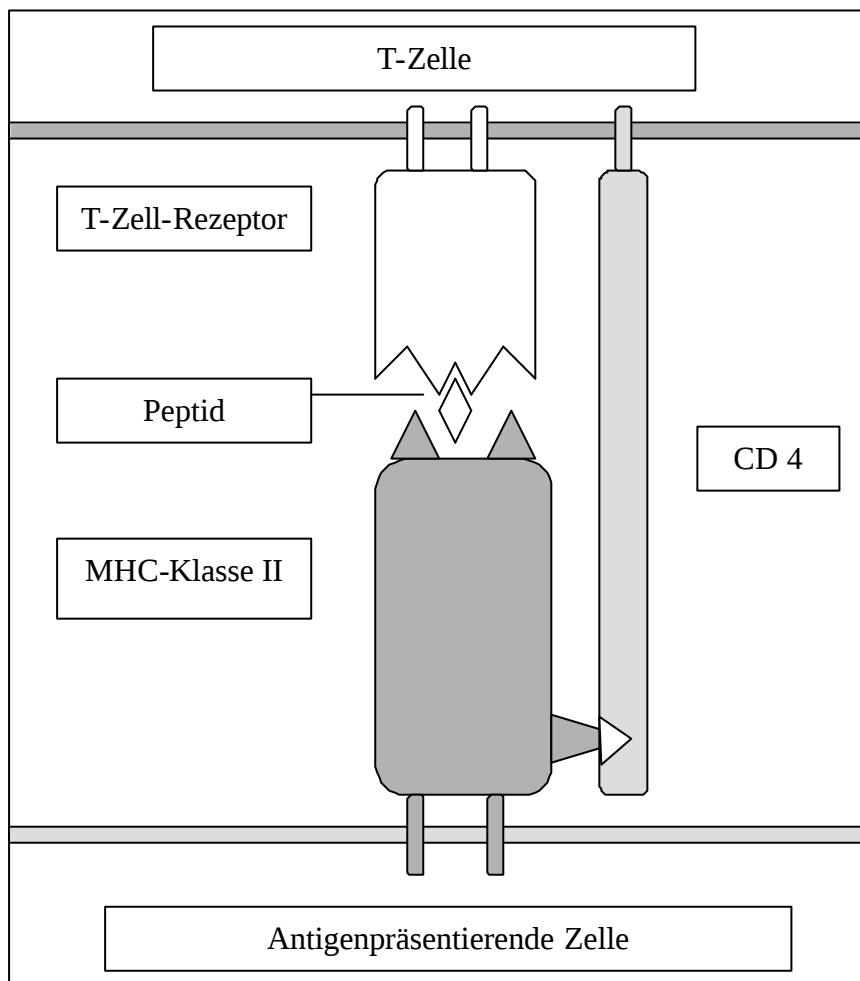


Abb. 1.2: Interaktion zwischen T-Zellrezeptor, Peptid-MHC II-Komplex und CD4-Korezeptor

1.1.1.2 Die humorale Immunität

Die humorale Immunität (lat. *humor*, Flüssigkeit), die sich vor allem gegen pathogene Mikroorganismen richtet, wird von antikörperproduzierenden Zellen getragen. Die B-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche sowohl Immunglobuline als auch MHC II-Proteine. Trifft eine B-Zelle auf ein Antigen, das an ihr spezielles Immunglobulin bindet, so schließt sie diesen

Antigen-Antikörper-Komplex ein, verdaut das Antigen teilweise und präsentiert seine Fragmente auf ihrer Oberfläche in Assoziation mit dem MHC II-Molekül.

Reife Helfer-T-Zellen, die einen spezifischen Rezeptor für diesen Komplex tragen, binden an die B-Zelle und setzen daraufhin Zytokine frei, welche die B-Zelle zur Proliferation und Differenzierung anregen. Die B-Zellen teilen sich so lange, wie sie von den Helfer-T-Zellen stimuliert werden. Die meisten Nachkommen der B-Zellen sind Plasmazellen, die darauf spezialisiert sind, den für das Antigen spezifischen Antikörper in großer Menge freizusetzen. Die Antikörper binden an das entsprechende Antigen und markieren es damit für den Abbau durch Phagozytose oder durch Aktivierung des Komplement-Systems, einer Gruppe von interagierenden Serumproteinen, die Zellen lysieren und lokale Entzündungserscheinungen auslösen können. Die meisten T- und B-Zellen leben ohne kontinuierliche Stimulation durch ihr Antigen nur wenige Tage.

1.2 Autoimmunerkrankungen

Da die Antigenrezeptoren der Lymphozyten durch einen Zufallsprozess entstehen, werden auch solche Zellen geprägt, die körpereigene Proteine erkennen. Diese Zellen unterliegen im allgemeinen der Kontrolle durch verschiedene Mechanismen, welche die Selbst-Toleranz sicherstellen. Jeder T-Lymphozyt besitzt Oberflächenrezeptoren (TCR) einer einzigen Spezifität, die sich durch zufällige Rekombination der variablen Rezeptorsegmente und der Zusammenlagerung zweier verschiedener, variabler Proteinketten herausbilden. Dadurch entstehen Lymphozyten, von denen jeder einen anderen Rezeptor trägt, so dass das gesamte Repertoire theoretisch jedes Antigen erfassen kann. Ist ein Rezeptor für eines der ubiquitären körpereigenen Antigene spezifisch, so wird der Lymphozyt im Thymus beseitigt, wenn er in der frühen Entwicklungsphase auf das Antigen trifft. Begegnet ein selbstreaktiver Lymphozyt nach der Reifung seinem eigenen Antigen im Gewebe, wird er im allgemeinen inaktiviert, da ein weiteres kostimulatorisches Signal erforderlich ist, das sich nur auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen, meist nur auf dendritischen Zellen, befindet.

Trotzdem können Antikörper oder T-Effektorzellen mit Spezifität für körpereigene Antigene entstehen. Diese autoantigenspezifischen T-Zellen werden in der Regel durch periphere Toleranzmechanismen inaktiviert. Bestimmte Entzündungsvorgänge, z.B. Infektionskrankheiten, können jedoch zu einer Aktivierung autoaggressiver T-Zellen führen, die dann durch die Zerstörung körpereigener Zellen, welche das entsprechende Antigen tragen, eine Autoimmunerkrankung auslösen können. Durch den Abbau der

autoantigenträgender Zelle gelangt das Autoantigen in die Peripherie und führt dadurch zu einer Perpetuierung der Autoimmunantwort. Autoimmunerkrankungen stellen kein allgemeines Versagen des Immunsystems dar, sondern sind wahrscheinlich Folge des Verlustes der zentralen oder peripheren Toleranz (Janeway 2001).

1.2.1 Bullöse Autoimmundermatosen

Bei den bullösen (blasenbildenden) Autoimmundermatosen finden sich in der Regel Autoantikörper gegen spezifische Adhäsionsstrukturen der Epidermis bzw. der dermoepidermalen Basalmembran. Anhand der dadurch bedingten Lokalisation des Adhäsionsverlustes erscheint folgende Einteilung sinnvoll:

Tabelle 1

Wichtige blasenbildende Autoimmundermatosen

<u>Lokalisation des Adhäsionsverlustes</u>	<u>Autoimmunerkrankung</u>
<u>Intraepidermal:</u>	
Subkorneal	Pemphigus foliaceus, - erythematosus
Suprabasal	Pemphigus vulgaris, - vegetans
<u>Dermoepidermale Junktionszone:</u>	
Lamina lucida	Bullöses Pemphigoid Vernarbendes Schleimhautpemphigoid Pemphigoid gestationis Lineare IgA-Dermatose
Lamina densa	Epidermolysis bullosa acquisita Dermatitis herpetiformis Duhring

Bläschen- oder Blasenbildung sind Folge einer Störung der intraepidermalen oder dermoepidermalen Adhärenz der Haut, die durch Ansammlung von Flüssigkeit verursacht ist oder diese sekundär mit sich führt. Blasenbildung als solche stellt eine grundsätzliche Reaktionsform der Haut auf verschiedene Traumata dar und ist in ihrer Pathogenese ebenso heterogen wie ihre Ursachen. Somit stellt sich die Frage, welche Strukturen zum Aufbau der Haut beitragen.

1.2.1.1 Aufbau der Haut

Die Haut schützt aufgrund ihrer Barrierefunktion den Organismus nicht nur vor mechanischen, thermischen und chemischen Einwirkungen, sondern sie ist zu einem wesentlichen Teil auch ein hochsensibles Kommunikationsorgan. Auf der einen Seite schließt sich der Körper durch die Haut von der Außenwelt ab, andererseits kommuniziert das Nervensystem durch die zahlreichen Sinnesrezeptoren der Haut wieder mit der Umwelt. Seit einigen Jahren ist ferner bekannt, dass die Haut ein wichtiges Immunorgan des Organismus darstellt. Epidermale Langerhans-Zellen gehören zu den dendritischen Zellen und spielen eine wichtige Rolle in der Induktions- und Effektorphase kutaner Entzündungsvorgänge. Ferner sind epidermale Keratinozyten in der Lage, durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine Entzündungsvorgänge in der Haut zu amplifizieren bzw. zu modulieren.

Die äußere Schicht der Epidermis gliedert sich von außen nach innen in Stratum corneum, Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale (Abb. 3). In dem einem hohen Verschleiß ausgesetzten Organ Epidermis läuft eine ununterbrochene Zellverschiebung von basal zur Oberfläche ab, wobei der Verhornungsgrad der einzelnen Zelle ständig zunimmt. Die Regenerationszone, zusammen mit der Keimschicht, heißt Stratum germinativum. Hier, insbesondere in der Basalzellschicht, findet durch Zellteilung ein fortlaufender Ersatz abgestoßener verhornter Epithelzellen statt. Über spezifische Strukturelemente - die Hemidesmosomen - sind die Basalzellen über die Basalmembran mit der unterliegenden Dermis verbunden (Christophers 1987).

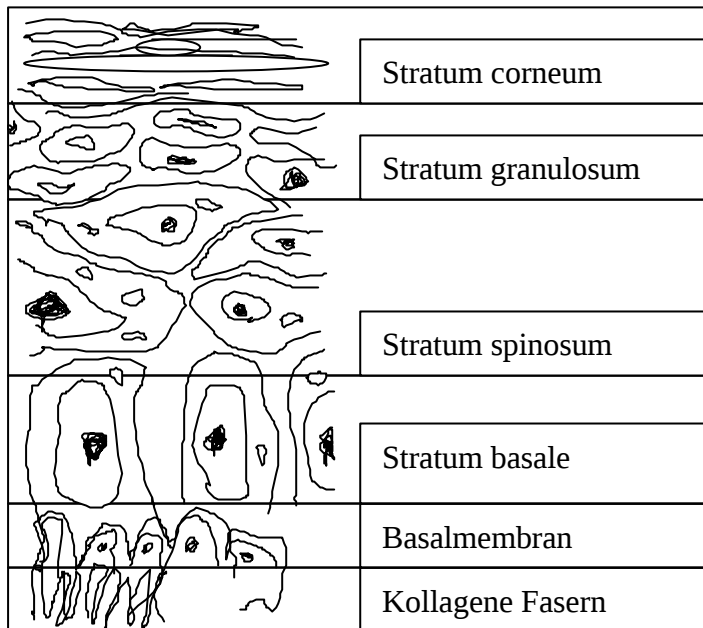


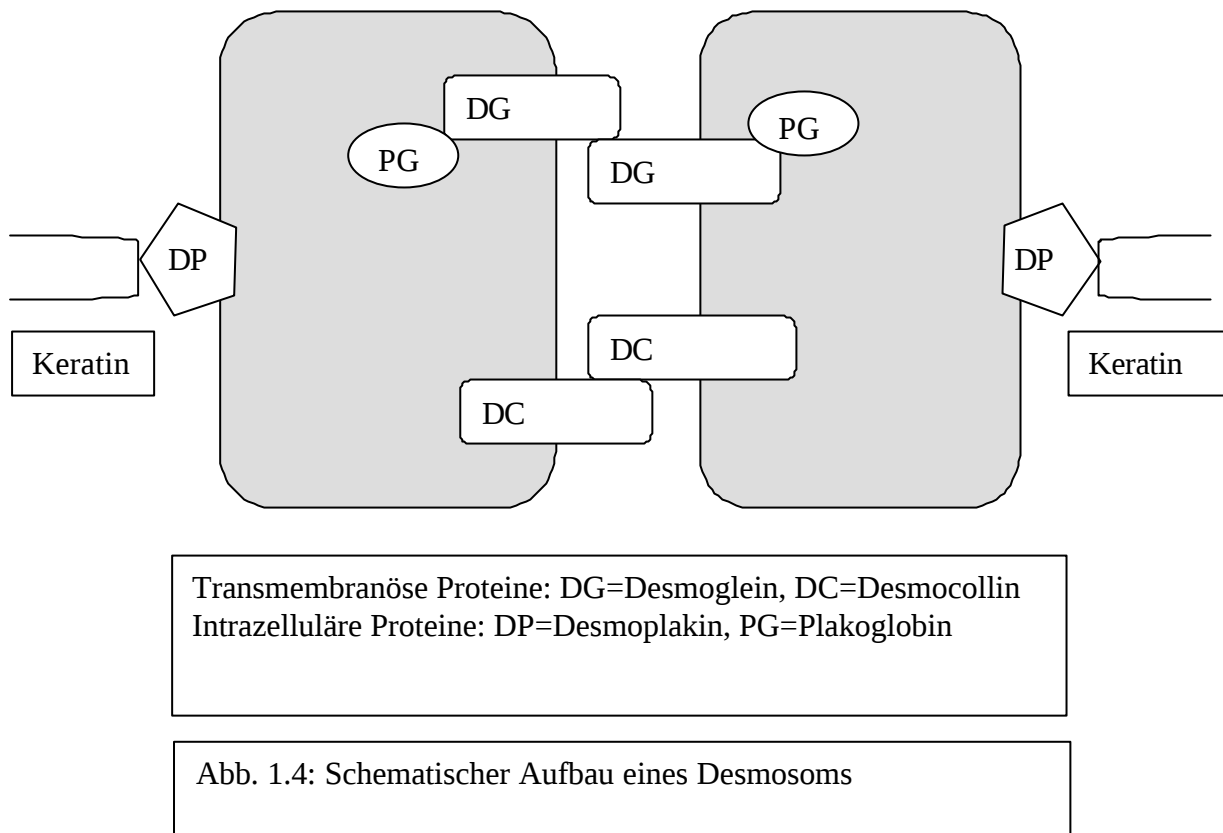
Abb. 1.3: Aufbau der Epidermis

1.2.2 Pemphigus vulgaris

Pemphigus vulgaris (PV) ist eine relativ seltene, aber klinisch bedeutsame Hauterkrankung, die aufgrund des ausgeprägten Befalls von Haut und Schleimhäuten unbehandelt häufig zum Tod führt. PV ist die klassische blasenbildende Autoimmundermatose, die hinsichtlich ihrer Pathogenese und immungenetischen Restriktion gut charakterisiert ist. Als erste konnten Beutner und Jordon Antikörper gegen kutane Proteine in Patientenseren nachweisen (Beutner 1964). Diese verursachen einen Verlust der epidermalen Zell-Zell-Adhäsion, der dann zu einer Blasenbildung führt. Die Autoantikörper richten sich gegen ein Adhäsionsmolekül mehrschichtiger Plattenepithelien, Desmoglein 3 (DG3) (Amagai et al 1991, 1992, Stanley et al 1989, 1993). Beim *Pemphigus foliaceus* (PF) finden sich Autoantikörper gegen ein strukturell verwandtes Protein, Desmoglein 1 (DG1). Allerdings haben neuere Untersuchungen ergeben, dass auch beim PV pathogenetisch bedeutsame Autoantikörper gegen DG1 auftreten (Ding et al 1999).

Desmogleine sind in Desmosomen lokalisierte transmembranöse Proteine, welche die Adhäsion zwischen Keratinozyten vermitteln. Im Zentrum des Desmosoms besteht ein 20-30 nm breiter, elektronenmikroskopisch erkennbarer Spalt, die sogenannte Desmoglia. Die Verbindungszonen der Desmosomen weisen sehr dichte Plaques am zytoplasmatischen Anteil auf, an die Keratinfilamente ansetzen. Hauptmembranproteine des Desmosoms sind Desmogleine (DG) und Desmocolline (DC), cadherinartige Proteine, welche eine homophile Ca^{2+} -abhängige Adhäsion vermitteln. Im Plaque sind diese transmembranösen Proteine direkt

oder indirekt mit den intrazellulären Plaqueproteinen Plakoglobin (PG) und Desmoplakin (DP) assoziiert (Abb. 4) (Amagai et al 1991, 1992, 1995, Karpati et al 1993, Koch et al 1990).



Der klinisch unterschiedliche Phänotyp von PV und PF ist durch die Spezifität der zirkulierenden Autoantikörper bedingt. Dies hängt zusammen mit der unterschiedlichen Expression der Desmogleine in Haut und Schleimhäuten. So wird in der Mundschleimhaut überwiegend DG3, aber kaum DG1 exprimiert, deswegen kommt es beim alleinigen Auftreten von Autoantikörpern gegen DG3 zur Blasenbildung an der Schleimhaut. In der Haut wird die Zell-Zell-Adhäsion durch DG1 und DG3 vermittelt, daher sind hier beide Autoantikörper nötig, um die für PV charakteristischen kutanen Blasen hervorzurufen. Sind Autoantikörper sowohl gegen DG1 als auch gegen DG3 vorhanden, tritt die Blasenbildung an Schleimhaut und Haut auf (mukokutaner oder generalisierter Pemphigus vulgaris) (Amagai et al 1996b, 1999, Ding et al 1997, Emery et al 1995, Hashimoto et al 1995, Mahoney et al 1999).

Die Bindung pemphigusspezifischer Antikörper an Epitope des N-terminalen extrazellulären Anteils der Desmogleine führt über noch wenig bekannte Mechanismen zur Beeinträchtigung der Keratinozytenadhäsion mit dem klinischen wie histopathologischen Bild intraepidermaler Blasenbildung (Abb. 5) (Amagai et al 1991). Dabei sind die pathogenetisch bedeutsamen

Autoantikörper vom Subtyp IgG4 (Mascaro et al 1997). In der indirekten Immunfluoreszenz zeigt sich bei PV ein perizelluläres Fluoreszenzmuster (Abb. 6).

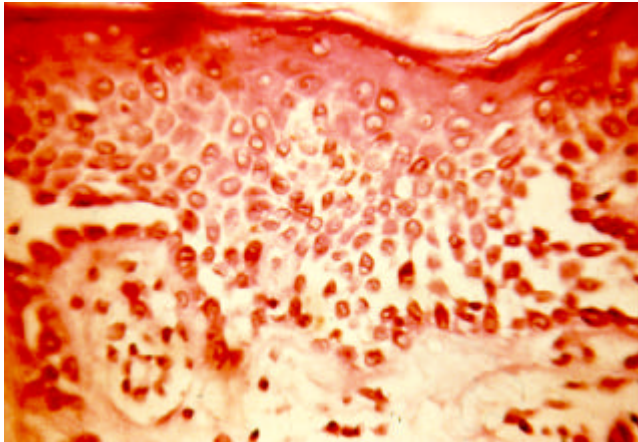


Abb. 1.5: Der Verlust der Zell-Zell-Adhäsion führt zur intraepidermalen Blasenbildung bei PV

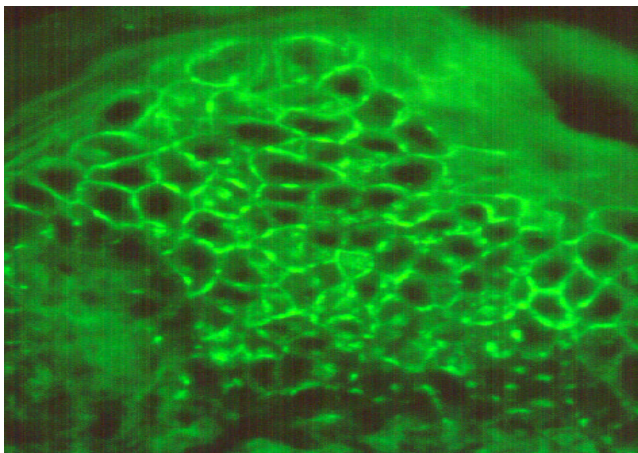


Abb. 1.6: Nachweis von Autoantikörpern bei PV in der indirekten Immunfluoreszenzuntersuchung

Das für DG3 codierende Gen ist auf Chromosom 18 lokalisiert (Arnemann et al 1992). Nach der Klonierung der DG3-cDNA (Amagai 1991) wurden zunächst bakterielle Fusionsproteine des DG3 generiert. Da diese prokaryotischen Proteine jedoch vermutlich nicht die korrekte Konformation besitzen, wurde DG3 in einem eukaryotischen Baculovirusexpressionssystem exprimiert. Dieses Protein besitzt die nötigen konformationellen Epitope, um Autoantikörper von PV-Patienten zu binden (Amagai et al 1994). Ferner bilden Kaninchen nach Immunisierung mit rekombinantem DG3 Antikörper, die in der indirekten Immunfluoreszenzuntersuchung auf Affenösophagus nachweisbar sind und nach Injektion in neugeborene Mäuse PV-ähnliche Blasen erzeugen (Amagai et al 1992, Memar et al 1996). Auch unserer Arbeitsgruppe steht ein rekombinantes, eukaryotisches DG3-Protein zur Verfügung, das den extrazellulären Anteil des DG3, verbunden mit dem Fc-Anteil von IgG (PVIg) oder einem 6xHis-Tag (PVHis), enthält.

An PV Erkrankte weisen eine Prävalenz bestimmter MHC II-Allele auf. Bei den Ashkenazi-Juden zeigen fast alle an PV Erkrankten den HLA-Typ DR β 1*0402 (Ahmed et al 1990), während das genannte Allel bei nichtjüdischen PV-Patienten vornehmlich südeuropäischer Abstammung weniger häufig auftritt (Ahmed et al 1991). Bei japanischen PV-Patienten fand sich eine signifikante Assoziation mit DQ β 1*0503 und verschiedenen DR β 1*14-Allelen (Yamashina et al 1998). Bei pakistanischen PV-Patienten ist das Vorhandensein DG3-spezifischer Antikörper ebenfalls an das Allel DR β 1*0503 gekoppelt (Delgado et al 1997). Die Allele DR β 1*1404, DRA1*0101 und DQ β 1*0503 fanden sich gehäuft bei indischen PV-Patienten (Delgado et al 1996). In diesem Zusammenhang sind auch Fälle zu nennen, in denen zwei MHC-haploidentische Brüder (Revenga-Arranz et al 1996) und verwandte Personen mit identischen HLA-DR β 1*0402, DQA1*0301 und DQ β 1*0302-Allelen an PV erkrankten (Bhol et al 1996). Besonders die Untersuchungen von Wucherpfennig erklären auf molekularer Ebene die Mechanismen der MHC-assoziierten Suszeptibilität für PV und andere Autoimmunerkrankungen. Dabei stellte sich das Allel HLA-DR β 1*0402 als besonders geeignet heraus, DG3-Peptide zu präsentieren (Wucherpfennig et al 1995a, 1995b). Die genannten Untersuchungen zur MHC II-Prävalenz beim PV zeigen, dass immungenetische Faktoren vermutlich eine Rolle bei der Pathogenese dieser Autoimmunerkrankung spielen. Diese Tatsache könnte zukünftig eine wichtige Rolle bei der Entwicklung spezifischer Immuntherapien spielen (Riechers et al 1999).

Klinische Beobachtungen und Versuche unterstreichen die pathogenetische Bedeutung DG3-spezifischer Autoantikörper beim Pemphigus vulgaris. So findet sich bei Neugeborenen, deren Mütter an PV erkrankt waren, eine vorübergehende Blasenbildung nach der Geburt. Dieser Zustand ist Folge des diaplazentaren Übertritts maternaler Immunglobuline (Merlob et al 1986). Ferner korreliert die Krankheitsaktivität mit dem Antikörpertiter im Serum von PV-Patienten. Immunglobuline aus Sera von PV-Patienten induzieren unter *in vitro*-Bedingungen eine Akantholyse in Hautorgankulturen (Schiltz et al 1976). Schließlich wurden Immunglobuline bzw. ihre Fab-Fragmente aus Seren von PV- und PF-Patienten isoliert und neugeborenen Mäusen injiziert. Dieser Transfer führte bei den Mäusen zu einer suprabasalen Blasenbildung mit intraepidermaler Akantholyse (Roscoe et al 1985, Amagai et al 1992).

Das klinische Erscheinungsbild des PV wird in erster Linie durch Autoantikörper verursacht. Dennoch sind besonders die T-Lymphozyten bei PV-Patienten von besonderem Interesse, da es wahrscheinlich ist, dass diese die B-Zell-Antwort induzieren und triggern. T-Zellen von PV-Patienten können *in vitro* mit rekombinantem DG3 stimuliert werden (Lin et al 1997a, 1997b, Hertl et al 1998a, 1998b). Auffallend ist dabei, dass auch T-Zellen von gesunden

Trägern PV-assoziiierter MHC-II-Allele (z.B. HLA-DRß1*0402) *in vitro* auf DG3 reagieren (Hertl 1998a, 1998b). Im Serum dieser gesunden Träger lassen sich gelegentlich Autoantikörper gegen DG3 nachweisen, die jedoch zur IgG1-Klasse gehören und als pathogenetisch unbedeutsam angesehen werden. Bei PV-Patienten, die sich in Remission befinden, findet möglicherweise ein Wechsel von DG3-Autoantikörpern der IgG4-Klasse (pathogen) zur IgG1-Klasse (nicht pathogen) statt (Bhol et al 1994, 1995).



Abb.1.7: Klinisches Erscheinungsbild des PV auf der Epidermis



Abb.1.8: Befall der Mundschleimhaut bei PV

1.3 Die SCID-Maus als *in vivo*-Modell humaner Autoimmunerkrankungen

Die Europäische Hausmaus (*Mus musculus musculus*) gehört in die Ordnung der Nagetiere (*Rodentia*), Familie Langschwanzmäuse (*Muridae*), Gattung Hausmaus (*Mus musculus*). Der Karyotyp lautet $2n = 40$ telozentrische Chromosomen, die Spezies ist genetisch sehr variabel. Der Zyklus des Weibchens dauert 4-5 Tage, die Wurfgröße beträgt 5-15 Jungtiere. Mit 4-6 Wochen sind die Tiere geschlechtsreif, die Lebensdauer beträgt etwa 2-3 Jahre. Seit Beginn des 20. Jahrhunderts wurden Hausmäuse systematisch für Laborzwecke gezüchtet.

Bei der routinemäßigen Radioimmunquantifizierung des Serumimmunglobulins von Mäusen, die in speziell pathogenfreien Räumen gehalten wurden, entdeckten Bosma et al. vier Mäuse, bei denen weder durch Radioimmunassay noch durch Immundiffusion IgM, IgA oder IgG nachgewiesen werden konnte. Eine Stammbaumanalyse ergab, dass es sich hierbei um einen autosomal-rezessiv vererbten Defekt handelt, der zu afunktionellen B- und T-Lymphozyten führt. Der Defekt erhielt den Namen *SCID* (*Severe Combined Immune Deficiency*) (Bosma 1983). Makrophagen sind jedoch vorhanden und funktionsfähig (Czitrom et al 1985), ebenso natürliche Killer (NK)-Zellen (Dorshkind et al 1985).

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass der *SCID*-Defekt auf dem Maus-Chromosom 16 lokalisiert ist. Er verhindert eine Reparatur von DNA-Schäden (Fulop et al 1990), denn den betroffenen Mäusen fehlt eine DNA-abhängige Kinase (p350), die zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und zur Rekombination der V(D)J-Segmente der T-Zellrezeptor- und Immunglobulingene benötigt wird. Dies ist die Ursache der fehlenden Funktion von B- und T-Lymphozyten (Kirchgessner et al 1995).

Es zeigte sich ferner, dass die Störung der Lymphozytenentwicklung nicht komplett ist, da mit zunehmendem Alter der Tiere niedrige Spiegel an Immunglobulin und intakten T-Lymphozyten nachweisbar sind. Diese Tiere werden als „leaky“ bezeichnet, da ihr Immundefekt sozusagen ein Leck aufweist. Mit zunehmendem Alter vergrößert sich der Anteil der Tiere, die als „leaky“ anzusehen sind, im Alter von 10-14 Monaten gehören praktisch alle *SCID*-Mäuse zu dieser Gruppe (Bosma et al 1988, Carroll et al 1988, 1989).

Mehrere Autoren geben unterschiedliche Grenzwerte für die „leakiness“ an (Chargui et al 1995, Duchosal et al 1992, Mosier et al 1988, Nonoyama et al 1993, Steinsvik et al 1995, Walker et al 1994). Sie reichen von Ig-Konzentrationen von 50 ng/ml (Chargui et al 1995) bis zu 10µg/ml (Duchosal et al 1992). In den meisten Untersuchungen wurden jedoch keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse zwischen „leaky“- und „non leaky“-*SCID*-Mäusen beobachtet.

Wegen ihrer Immundefizienz wurden *SCID*-Mäuse unter anderem zu *in vivo*-Untersuchungen zur Infektiologie mit Viren (Chow et al 1992, George et al 1990), Bakterien (Deschryver-Kecskemeti et al 1988, Museteanu et al 1991), Pilzen (Narayanan et al 1991) und Parasiten (Nelson et al 1991) verwendet. Daneben wurde auch die Funktion von Lymphozyten bei der Entwicklung nichtlymphozytärer Anteile untersucht, z.B. von dendritischen Zellen (Czitrom et al 1985).

1.3.1 Rekonstitution der *SCID*-Maus mit menschlichen Lymphozyten

SCID-Mäuse können mit Lymphozyten gesunder Mäuse rekonstituiert werden (Fulop et al 1986). Wegen der Immundefizienz kommt es zu keiner Abstoßungsreaktion. Als Erweiterung dieser Möglichkeit gelang es Mosier et al, *SCID*-Mäuse mit peripheren menschlichen Lymphozyten (PBL) zu rekonstituieren (Mosier et al 1988). Menschliche PBL siedeln sich in den lymphatischen Organen der Maus an und bleiben über längere Zeit lebensfähig. Auch Immunantworten können *in vivo* induziert werden, z.B. gegen Tetanus-Toxoid. Als Meßwert für den Erfolg der Rekonstitution mit menschlichen PBL wird die Konzentration humaner Immunglobuline in den Mausseren verwendet.

Die Zellen wurden den Mäusen intraperitoneal (i.p.) injiziert, da eine intravenöse Injektion ineffektiv war. Die optimale Zellzahl liegt bei 20×10^6 PBL/Maus. Werden weniger Zellen injiziert, ist die Etablierung eines menschlichen Immunsystems weniger erfolgreich. Bei Injektion einer größeren Zellzahl kommt es gehäuft zum Auftreten humaner Lymphome, besonders bei Transfer von PBL Epstein-Barr-Virus (EBV)-positiver Spender (Mosier et al 1988).

An solche Mensch-Maus-Chimären sind große Hoffnungen geknüpft, z.B. bei der Entwicklung von Impfstoffen, beispielsweise gegen HIV (Chargui et al 1995, Mosier et al 1991), Influenza-Virus (Albert et al 1997) und *Haemophilus influenzae* b (Lucas et al 1992). Immunantworten gegen unterschiedliche Neo- und Recallantigene wurden bei humanisierten *SCID*-Mäusen untersucht (Bombil et al 1996, Duchosal et al 1992, Nonoyama et al 1993, Walker et al 1994). Dabei stellten Pestel et al fest, dass bei *SCID*-Mäusen, die mit PBL von Allergikern rekonstituiert wurden, eine i.p. Boosterung mit dem Allergen, z.B. *Dermatophagoides pteronyssinus*, zur erhöhten Bildung von spezifischem IgE und IgG4 führte. Bei Mäusen, die mit PBL von Nichtallergikern rekonstituiert wurden, führte die Boosterung zur Bildung von allergenspezifischem IgG (Pestel et al 1994).

1.3.1.1 Die *SCID*-Maus in der autoimmunologischen Forschung

Als erste führten Krams et al einen Transfer von PBL von Patienten mit Autoimmunerkrankungen in *SCID*-Mäuse durch. Sie rekonstituierten *SCID*-Mäuse mit Lymphozyten von Patienten mit primär biliärer Zirrhose (PBC) und konnten bei allen Mäusen, deren Serum humanes Ig enthielt, auch die für PBC charakteristischen Autoantikörper nachweisen (Krams et al 1989). Tighe et al rekonstituierten *SCID*-Mäuse mit PBL von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Durchschnittlich 12% des humanen IgM im Maus-Serum besaßen Rheumafaktor-Aktivität (Tighe et al 1990). Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen wurden von Macht et al in *SCID*-Mäusen untersucht. Nach Transfer von PBL von Patienten mit Autoimmunthyroiditiden und hohem Autoantikörpertiter konnten im Maus-Serum ebenfalls Antikörper gegen Thyroglobulin und Thyroid-Peroxidase nachgewiesen werden (Macht et al 1991, 1993). Auch der systemische Lupus erythematosus (SLE) wurde bereits im *SCID*-Maus-System untersucht (Dickey 1994, Duchosal 1990). Dabei ließen sich nach Transfer der PBL von SLE-Patienten in *SCID*-Mäuse in den meisten Mausseren antinukleäre Antikörper (ANA) nachweisen (Duchosal 1990). Da das Modell der mit menschlichen PBL rekonstituierten *SCID*-Maus für die Erforschung von Autoimmunkrankheiten vielversprechend ist, wurde dieser *in vivo*-Versuchsansatz bereits in zahlreichen Übersichtsarbeiten behandelt (Barry 1992, Duchosal 1992, Elkon 1993, Hammarström 1993, Vladutiu 1993, 1994).

Es wurde bereits der erfolgreiche Versuch unternommen, ein aktives Tiermodell des Pemphigus in der *SCID*-Maus zu etablieren. Juhasz et al untersuchten *SCID*-Mäuse, denen PBL von PV-Patienten injiziert wurden. 69% der untersuchten Mäuseseren wiesen Human-Ig-Spiegel von $> 0,1$ mg/ml auf. Bei 20 dieser 34 Tiere konnten in der indirekten Immunfluoreszenzuntersuchung zirkulierende PV-Autoantikörper nachgewiesen werden. Nach Traumatisierung durch Hitze oder Kälte fanden sich in der Haut von 44% der 34 Tiere Ablagerungen menschlicher IgG-Antikörper. Spontane PV-artige Blasen wurden in der Maushaut nicht beobachtet. Jedoch führte der Transfer von PBL von PV-Patienten in *SCID*-Mäuse, denen menschliche Haut zuvor transplantiert wurde, zum Auftreten PV-typischer Hautläsionen (Juhasz et al 1993).

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll durch Injektion peripherer Lymphozyten von PV-Patienten in immundefiziente *SCID*-Mäuse ein Tiermodell des PV etabliert werden, das es ermöglicht, die Rolle autoreaktiver T-Lymphozyten bei der Regulation der Produktion von Autoantikörpern in einem „humanisierten“ *in vivo*-Modell zu untersuchen. Als Readout soll die Produktion humaner, DG3-spezifischer Autoantikörper dienen und nicht, wie in den vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Juhasz angestrebt, die schlecht reproduzierbare und objektivierbare intraepidermale Blasenbildung an Haut und Schleimhäuten. Der Nachweis gewebegebundener Autoantikörper soll durch Immunfluoreszenzuntersuchung der Haut und Schleimhäute erfolgen. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob die Immunisierung mit DG3 von *SCID*-Mäusen, die mit Lymphozyten HLA-homologer Gesunder rekonstituiert wurden, ebenso zur Induktion humaner Autoantikörper gegen DG3 führt.

Die spezifischen Ziele dieser Arbeit sind somit folgende:

1. Rekonstituierung von *SCID*-Mäusen mit Lymphozyten von PV-Patienten. Readout ist der Nachweis humaner Antikörper mit Spezifität gegen DG3 in den Mausseren mittels indirekter Immunfluoreszenz.
2. Nachweis gewebegebundener Autoantikörper gegen desmosomale Adhäsionsmoleküle in den „humanisierten“ *SCID*-Mäusen. Readout ist die direkte Immunfluoreszenz von Maushaut und -schleimhäuten.
3. Versuch der Induktion DG3-spezifischer humaner Autoantikörper durch Rekonstituierung von *SCID*-Mäusen mit Lymphozyten von HLA-homologen (d.h. DR β 1*0402+) Gesunden; als Kontrolle dient der Transfer von Lymphozyten eines HLA-heterologen gesunden Spenders. Readout ist auch hier der Nachweis humaner Antikörper gegen DG3 in den Mausseren mittels indirekter Immunfluoreszenz und der Nachweis gewebegebundener Antikörper mittels direkter Immunfluoreszenz.

Dieses Modell soll es ermöglichen, die Rolle spezifischer, PV-assoziiierter HLA Klasse II-Allele bei der Induktion autoreaktiver T-Zellantworten gegen DG3 zu untersuchen. Ferner soll mit Hilfe humanisierter *SCID*-Mäuse ein Tiermodell geschaffen werden, in dem durch Modulation autoreaktiver T-Zellen die Autoantikörperproduktion *in vivo* gehemmt wird.

2 Material und Methoden

2.1 Produktion und Aufreinigung des rekombinanten DG3

2.1.1 Das Baculovirus-Expressionssystem

Baculoviren sind insektenpathogene und insektenspezifische Viren, die zu den Kernpolyhedrosis-Viren gehören. Das *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV) - im Folgenden auch als Wildtyp bezeichnet - befällt mehr als 30 verschiedene Insektenspezies aus der Familie der *Lepidoptera*. Das Virus-Genom besteht aus doppelsträngiger DNA. Transfervektoren, die ein heterologes Gen enthalten, können mittels Kotransfektion mit Baculoviren zusammen in Insektenzellen eingeschleust werden. Durch *in vivo*-Rekombination und Selektion werden infektiöse Viren mit eingebautem Fremdgen erhalten. Für die Verwendung von Baculoviren zur Proteinexpression ist die Kultivierung von Insektenzellen als Wirtszellen Voraussetzung. Gebräuchlich sind Zellkulturen der Species *Spodoptera frugiperda* und *Trichoplusia ni*.

Ein Vorteil des Baculovirus-Expressionssystems gegenüber prokaryotischen Systemen besteht darin, daß die in den Insektenzellen produzierten eukaryotischen Fremdproteine solchermaßen prozessiert und modifiziert werden, daß sie sich in ihrer Struktur nicht von den Proteinen der eukaryotischen Ursprungszelle unterscheiden. Da die Expression der Fremd-DNA unter der Kontrolle eines starken Promotors steht, können auch große Mengen des gewünschten Proteins hergestellt werden (bis 1 mg pro $1-2 \times 10^6$ infizierte Zellen). Die rekombinanten Baculoviren wurden von Dr. Masayuki Amagai (Keio Universität, Tokio, Japan) zur Verfügung gestellt.

In der hier durchgeführten Untersuchung wurde ein Konstrukt des Desmoglein 3 (DG3), PVhis, verwendet. Es enthält die extrazellulären Domänen EC 1-5 des DG3 und als Liganden ETag und 6 x Histidin.

2.1.1.1 Insektenzellen und Kulturmedien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Insektenzelllinien der Lepidoptera-Art *Spodoptera frugiperda* (SF21, Invitrogen) wurden adhärent in Zellkulturflaschen (Falcon) bei 27°C kultiviert. Als Medium wurde Grace's Insect Medium (Gibco BRL) mit folgenden Zusätzen verwendet: L-Glutamin 1:100 (Gibco BRL), Penicillin/Streptomycin 1:100 (Gibco BRL), Pluronic F-6 1:100 (Gibco BRL) und Fötales Kälberserum 10% (FKS Boehringer).

Die Zellen wurden in 175 cm²-Flaschen ausgesät und dann subkultiviert, wenn sie konfluent gewachsen waren und sich durch geringe tangentielle Scherkräfte vom Boden der Kulturflasche ablösen ließen. Die adhärenenten Insektenzellen wurden mit Insektenmedium vom Flaschenboden abgespült. Anschließend wurden die suspendierten Insektenzellen gezählt und für weitere Versuche verwendet bzw. zur Aufzucht gesplittet. Dazu wurde der Zellinhalt auf zwei 175 cm²-Flaschen verteilt, mit Insektenmedium aufgefüllt und bei 27°C kultiviert, bis die Zellen erneut konfluent wuchsen.

2.1.1.2 Virusamplifikation

Zur Herstellung hochtitriger Viruslösungen wurden Insektenzellen mit dem zur Verfügung gestellten Kulturüberstand, der das transfizierte Baculovirus enthielt, so infiziert, daß das Verhältnis von Viren zu SF21-Zellen (Multiplicity Of Infection, MOI) < 1 war. So wurde vermieden, daß eine Rückrekombination der Viren zum Wildtyp stattfand, da jede Insektenzelle höchstens von einem Virus infiziert werden kann.

Für die ersten Amplifikationen wurden ca. 60×10^6 SF21-Zellen in eine Kulturflasche mit 175 cm² Kulturoberfläche ausgesät. Nachdem die Zellen auf der Plastikoberfläche angehaftet waren, wurde eine der MOI entsprechende Menge Baculovirusüberstand in einem Gesamtvolumen von 8-10 ml Medium zu den Zellen gegeben, die anschließend 75 min bei RT inkubiert wurden. Während dieser Infektionszeit wurden die Kulturflaschen im Abstand von je 15 min leicht geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen mit ca. 20 ml Kulturmedium versehen und für 7 Tage bei 27°C inkubiert. Die erfolgreiche Infektion der Zellen zeigte sich nach 2-3 Tagen durch das Anschwellen der Zellen und durch den Zelltod, der durch Färbung mit Trypanblau (Gibco BRL) nachgewiesen wurde.

Um größere Mengen an Baculoviren zu produzieren, wurden die Insektenzellen in einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml Medium in einer Rührflasche suspendiert und mit dem Kulturüberstand des zu amplifizierenden Baculovirus für 7 Tage unter leichtem Rühren inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 2000 rpm für 10 min abzentrifugiert und der virushaltige Überstand im Dunklen bei 4°C gelagert.

2.1.1.3 Produktion von rekombinantem DG3

Für die Expression von rekombinantem DG3 wurden Zellen der Linie SF21 verwendet. Ca. 30×10^6 Insektenzellen wurden in 175 cm²-Kulturflaschen (Falcon) ausgesät und mit dem PVHis-Baculovirus in einer MOI von etwa 10 inokuliert. Zur Proteinproduktion wurde ein größeres Verhältnis von Viren zu Insektenzellen gewählt, um die Wahrscheinlichkeit der Infektion jeder Zelle zu erhöhen. Die Gefahr der Rückrekombination transfizierter Baculoviren zum Wildtyp konnte hier vernachlässigt werden, da die gewonnenen Kulturüberstände nicht zur Infektion weiterer Zellen verwendet wurden. Nach der Infektionszeit von 75 min bei RT, während der die Flaschen in 15-minütigen Abständen geschwenkt wurden, wurde die Viruslösung aus den Kulturflaschen abgenommen und frisches Medium zugegeben. Die Zellen wurden für 3 Tage bei 27°C inkubiert. Dann wurden die Insektenzellen abgenommen und bei -20°C gelagert.

2.1.2 Lebendzellfärbung mit Trypanblau und Bestimmung der Zellzahl

Anteile der Insektenzellsuspension wurden mit Trypanblau (Gibco BRL) zu gleichen Teilen in einer Mikrotiterplatte vermischt und auf das Zählfeld einer Neubauer-Kammer aufgetragen. Zellen, die infolge defekter Membranen den Farbstoff aufgenommen hatten und im mikroskopischen Bild daher blau erschienen, wurden als tot gewertet und bei der Errechnung der Zahl lebender Insektenzellen nicht berücksichtigt. Nach Auszählung zweier Großquadrate des Zählkreuzes ergab sich die Zellkonzentration folgendermaßen: gezählte Zahl $\times 10^4$ = Zellzahl/ml.

2.1.3 Nachweis von rekombinantem DG3

2.1.3.1 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurden folgende Reagenzien verwendet:

Gel:	10% Tris/Glycin-Gel	(Bio-Rad)
Laufpuffer:	Tris/Glycin/SDS-Puffer (1x)	(Bio-Rad)
Auftragspuffer:	Laemmli-Puffer + β -Mercaptoethanol (50 μ l auf 950 μ l Laemmli-Puffer)	(Bio-Rad)
Standard:	Prestained SDS-PAGE Standard (Low Range)	(Bio-Rad)

Die Mini-Fertiggele wurden in eine entsprechende Elektrophorese-Apparatur (Bio-Rad) nach Vorschrift des Herstellers eingespannt, der Laufpuffer in die Kammer gefüllt und die Standardlösung bzw. die im Verhältnis 1:2 in Laemmli-Puffer verdünnten Proteinlösungen (30 μ l) mittels einer Mikroliterspritze (Hamilton) in die Geltaschen gefüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte dann über 90 min bei 125 V unter Kühlung der Elektrophoresekammer mit Eis. Anschließend wurden die auf dem Gel aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose-Membranen übertragen (Western Blot).

2.1.3.2 Western Blot

Der Protein-Transfer auf Nitrocellulose-Membranen wurde in einer Blotting-Apparatur von Bio-Rad unter Kühlung bei 4°C durchgeführt. Folgende Reagenzien und Versuchsparameter wurden angewendet:

Puffer:	Tris/Glycin-Puffer	(Bio-Rad)
Membranen:	Nitrocellulose (0,45 μ m)	(Schleicher&Schuell)
Filterpapier:	Gel Dryer Model 543	(Bio-Rad)
Transferdauer:	60 min	
Stromstärke:	200 mA	

Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose-Membran in einer Lösung aus PBS (1x, Gibco BRL) und ca. 5% fettfreiem Milchpulver (Bio-Rad) für 2-4 h auf dem Taumler blockiert.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (Mouse anti-ETag, nicht-konjugiert, Pharmacia) in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS/Milchpulver (ca. 2%). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei RT auf dem Taumler. Der ungebundene Erstantikörper wurde in drei Waschschritten von je 10 min Dauer abgewaschen (1. und 2. Waschpuffer: 1x PBS + 0,05% TWEEN 20 (Bio-Rad), 3. Waschpuffer: 1x PBS). Die Membran wurde dann nochmals für 1h blockiert (s.o.), bevor der enzymgekoppelte (alkalische Phosphatase) Zweitantikörper zugegeben wurde. Nach einstündiger Inkubation wurde der ungebundene Zweitantikörper wie oben abgewaschen. Der Entwicklungsschritt erfolgte durch etwa fünfminütiges Eintauchen der Membran in eine Substratlösung für alkalische Phosphatase (Kirkegaard & Perry).

2.1.4 Proteinaufreinigung

2.1.4.1 Lyse von Insektenzellen

Um intrazelluläre Proteine aus baculovirusinfizierten Insektenzellen zu isolieren, wurden die infizierten Zellen mit Lysispuffer (Pharmingen) aufgeschlossen. Ca. 10×10^6 Zellen wurden in 1 ml eiskaltem Lysispuffer, der mit einem Proteaseinhibitor-Cocktail (1x, Pharmingen) versetzt war, resuspendiert. Nach kurzer Resuspension mit dem Schüttler wurde die Zellsuspension für mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Das Zelldebris wurde anschließend abzentrifugiert und das klare Lysat weiterverarbeitet.

2.1.4.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung

Das rekombinante DG3-Protein PVhis besitzt einen Etag-Liganden und einen 6xHis-Rest, wodurch die affinitätschromatographische Aufreinigung erleichtert wird. In dieser Arbeit wurde PVhis über den 6xHis-Rest an eine Nickelmatrix gebunden und kompetitiv eluiert. Der Elutionspuffer enthielt Imidazol, das eine höhere Affinität zum Nickel besitzt als die Histidinreste des rekombinanten Proteins. Um eine Bindung des His-gebundenen Proteins an die Matrix zu ermöglichen, wurde die „Batch“-Methode angewendet. Dazu wurde das PVhis-haltige Zellysat zunächst für mehrere Stunden bei 4°C unter Schwenken mit dem Nickelgel inkubiert, um eine längere Interaktion zwischen Nickelmatrix und His-gebundenem Protein zu ermöglichen.

Im Folgenden wird der genaue Versuchsablauf beschrieben:

1. Austausch des Lysispuffers gegen Bindungspuffer (1x, Novagen) anhand spezieller Zentrifugationssysteme (Centriprep 30, Amicon).



2. Vorbereitung des Ni-Agarosegels: Waschen von Ni-NTA-Agarosegel (Quiagen) mit Aqua dest. (1:7) in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen. Abzentrifugieren des Gels (1200 rpm, 3 min), Verwerfen des Überstands.



3. Beladung des Gels durch Inkubation (3 min) mit dem fünffachen Volumen von Ladungspuffer (1x, Novagen), Abzentrifugieren des Gels (1200 rpm, 3 min), Verwerfen des Überstands.



4. Equilibrierung der Ni-Agarose mit Bindungspuffer (1:5), Abzentrifugieren (s.o.).



5. Inkubation des umgepufferten Zellysats für mehrere Stunden (über Nacht) mit dem equilibrierten Ni-NTA-Agarosegel auf dem Taumler bei 4°C.



6. Abzentrifugieren des Gels, Aufbewahren des Überstands (1. Fraktion). Zwei Waschgänge mit jeweils fünffachem Volumen von Bindungspuffer (Überstand nach Zentrifugation sammeln = 2./3. Fraktion).



7. Elution des gebundenen Proteins: Inkubation des Ni-Gels mit dem zweifachen Volumen von Elutionspuffer (1x, Novagen) für 20 min, Vorgang 2-3x wiederholen nach jeweiligem Abzentrifugieren des Gels (Überstände werden als Eluat 1-3 bezeichnet und bis zum Nachweis des eluierten Proteins als getrennte Fraktionen aufbewahrt).



8. Vereinigen der proteinhaltigen Eluatfraktionen und Dialyse gegen PBS (24 h, nach je 8 h Austausch des PBS) in Dialyse-Schläuchen (Gibco BRL) bei 4°C.



9. Die dialysierten Eluatfraktionen wurden anschließend aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.1.4.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur quantitativen Proteinbestimmung wurde die Lowry-Methode mit Reagenzien von Bio-Rad angewendet. Um möglichst geringe Proteinmengen zu verbrauchen, wurden die Ansätze in Mikrotiterplatten pipettiert. Pro Ansatz wurden jeweils 20 µl Probe, dann 10 µl Reagenz A und anschließend 80 µl Reagenz B in eine Vertiefung der Platte gegeben. Nach 15-60 min Inkubation bei RT konnte die Platte im ELISA-Reader photometrisch bei 750 nm ausgewertet werden. Als Eichreihe dienten in PBS verdünnte BSA-Lösungen (Bio-Rad) mit den Konzentrationen 0, 75, 150 und 450 µg/ml; der Leerwert enthielt nur PBS.

2.2 Humane Lymphozyten

2.2.1 Separierung humaner Lymphozyten

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden durch Zentrifugation über einen Dichtgradienten isoliert (Standardmethode nach Bøyum). Heparinisiertes (1 U/ml) venöses Blut wurde mit gleichen Teilen 1x PBS (Gibco BRL) vermischt und mit 10 ml Lymphoflot (Biotest) in 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Costar) unterschichtet. Durch anschließende Zentrifugation (2000 rpm, 24 min, ohne Bremse) wurden die mononukleären Zellen von Erythrozyten und Granulozyten getrennt. Die opaque Bande oberhalb der Lymphoflot-Phase enthielt Lymphozyten und Thrombozyten, unterhalb der Lymphoflotfraktion sedimentierten Erythrozyten und Granulozyten. Die lymphozytenreiche Schicht wurde mit einer Pipette abgenommen und in einem neuen Röhrchen mit PBS bis 50 ml aufgefüllt. Das nach Zentrifugation (1600 rpm, 10 min) erhaltene Zellsediment wurde erneut mit PBS resuspendiert, und die Zellen wurden dann erneut bei 1200 rpm für 10 min abzentrifugiert.

Dieser Waschschritt diente der Entfernung von Thrombozyten und wurde mehrfach wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen.

2.2.2 Vorbereitung der Zellen für die i.p.-Injektion

Die wie oben angegeben separierten peripheren Lymphozyten wurden in RPMI (GibcoBRL) + 5% autologem Serum aufgenommen und für die Injektion vorbereitet. Dabei wurden die Zellen für 3 h mit bzw. ohne Antigen inkubiert. Eine erste Gruppe wurde ohne Antigen inkubiert. Einer zweiten Gruppe wurde als Antigen aufgereinigtes PVhis in einer Konzentration von etwa 160 µg/ml zugegeben. Eine dritte Gruppe erhielt zur Kontrolle Wildtyp (WT)-Protein, welches durch Wildtyp-Baculoviren in SF 21-Zellen gebildet und auf dieselbe Weise wie PVhis aufgereinigt wurde, in einer Menge von je 1 ml Proteinlösung auf 5 ml Zellsuspension. Nach Antigeninkubation wurden durch mehrere Waschschritte wie bei der Zellseparierung ungebundenes DG3 und RPMI entfernt und die Zellen in 1x PBS aufgenommen. Die Konzentration wurde auf etwa 40×10^6 Zellen/ml eingestellt, den Mäusen wurden anschließend ca. 20×10^6 Zellen in einem Volumen von 0,5 ml PBS intraperitoneal injiziert.

2.3 SCID-Mäuse

Die eingesetzten Mäuse gehörten zum Stamm *SCID C.B. 17* und wurden von Harlan Netherlands geliefert. Alle Tiere waren weiblichen Geschlechts und bei Versuchsbeginn ca. 4-6 Wochen alt.

Die Mäuse wurden in mehrere Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe (n = 24) erhielt Lymphozyten einer gesunden Spenderin mit einem HLA-Genotyp, der bei PV nicht prävalent ist (DRβ1* 0102, 1301, DQβ1* 0501, 0603). Teilweise wurden die Zellen vor dem Transfer mit rekombinantem DG3 oder Wildtyp-Protein (WT) inkubiert.

Die zweite Gruppe (n = 16) erhielt PBL eines PV-Patienten (DRβ1* 0402, 1301, DQβ1* 0302, 0603). Wieder wurden die Zellen vor Transfer teilweise mit PVHis oder WT inkubiert. Einer dritten Gruppe (n = 24) wurden PBL eines gesunden Spenders mit bei PV prävalentem HLA-Genotyp injiziert (DRβ1* 0402, 1501, DQβ1* 0302, 0602).

In einem zweiten Ansatz wurden *SCID*-Mäuse (n = 30) mit Lymphozyten des Patienten und des gesunden Spenders mit bei PV prävalentem HLA-Genotyp (s. Gruppe 3) rekonstituiert.

Zwei und vier Wochen nach Zelltransfer wurden die Mäuse durch eine i.p.-Injektion mit PVHis geboostet.

Untersucht wurde bei den Mäusen die Gesamt-Human-Ig-Konzentration im Serum sowie das Vorhandensein von PV-Autoantikörpern durch indirekte Immunfluoreszenz auf Affenösophagus. Zusätzlich wurden direkte Immunfluoreszenzuntersuchungen an Mausgewebe durchgeführt.

2.3.1 Haltungsbedingungen

Die Tiere wurden in der Zentralabteilung für Versuchstierkunde der RWTH Aachen unter pathogenfreien Bedingungen in Typ 3-Makrolonkäfigen mit Edelstahldeckel gehalten. Entstaubte Weichholzfaser wurde als Einstreu verwendet. Gefüttert wurden die Mäuse mit Alleinfutter für Maus RM 204 (Altramin), das Tränkewasser wurde durch zweifache Ozonierung und Ansäuerung (pH 4-5) keimfrei gemacht und in Makrolon-Tränkeflaschen mit Edelstahlkappe gegeben. Futter und Wasser standen den Mäusen ad libitum zur Verfügung. Die Temperatur im Tierraum betrug $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, die relative Luftfeuchtigkeit $60\pm 10\%$. Der Hell-Dunkel-Rhythmus war auf 12 h : 12 h eingestellt.

2.3.2 Intraperitoneale Injektion menschlicher mononukleärer Zellen

Die Maus wurde manuell in Rückenlage fixiert und der Kopf des Tieres dabei etwas nach unten gereigt. Die Injektionsnadel (Terumo, 27 G) wurde unter Vermeidung der abdominalen Mittellinie im linken oder rechten unteren Quadranten des Abdomens angesetzt. Nach Aspiration zum Ausschluß einer intravasalen Injektion wurde die Zellsuspension zügig i.p. injiziert.

2.3.3 Boosterung der Mäuse

Die Maus wurde wie bei der Injektion menschlicher Lymphozyten fixiert. Dann wurde jeder Maus 20 µg aufgereinigtes und durch Vorerhitzung keimfrei gemachtes DG3 in je 500 µl 1x PBS intraperitoneal injiziert (Vorgehen s.o.).

2.3.4 Blutentnahme

2.3.4.1 Punktion des retroorbitalen Venenplexus

Mäuse besitzen einen retroorbital gelegenen Venenplexus, dessen Punktion für die Blutentnahme geeignet ist. Dazu wurden die Tiere in einer Narkosekammer (Assistent) mit Forene (Abbott) durch Inhalationsnarkose betäubt. Während der Narkose wurde den Mäusen durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus mit einem heparinisierten Kapillarröhrchen (Assistent) jeweils ca. 100 - 150 µl Blut entnommen, das in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen wurde. Die Blutproben wurden anschließend in einer Epifuge (Heraeus) bei 12000 rpm 5 min zentrifugiert. Danach wurde das Serum abgenommen und bis zu weiteren Untersuchungen bei -20°C aufbewahrt.

2.3.4.2 Herzpunktion

Die Tiere wurden wiederum in der Narkosekammer mit Forene narkotisiert. Während der Narkose wurde das Tier in Rückenlage fixiert und mit einer Kanüle (Terumo, 27 G) unmittelbar links und unterhalb des Processus xiphoideus an der Basis des Sternums in einem Winkel von 15-20° das Herz punktiert. Das Blut wurde in einer mit Heparin benetzten Spritze (B. Braun Melsungen) aufgenommen, um Lymphozyten isolieren zu können. Nach erfolgter Blutentnahme wurde das Tier durch zervikale Dislokation getötet. Die Herzpunktion wurde ausgeführt durch Herrn Dr. sc. agr. R. Kluge, Institut für Versuchstierkunde der RWTH Aachen.

2.3.5 Organentnahme

Nach Tötung durch zervikale Dislokation wurden den Mäusen für weitere Untersuchungen Organe und Gewebeproben entnommen. Dabei wurden Milz, Ohr, Nasenspitze, Zunge und Bauchhaut entfernt und in Gefriermedium (Microm) in Cryo-Tubes (NUNC) bei -80°C eingefroren.

2.4 Untersuchungen an Blut- und Gewebeproben der SCID-Mäuse

2.4.1 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) zum Nachweis von murinen und humanen Immunglobulinen

Der enzymgekoppelte Immunnachweis ist ein effizientes Verfahren zum Nachweis von Proteinen. In dieser Arbeit wurde ein sogenannter Sandwich-ELISA angewendet, bei dem das gesuchte Protein (hier ein Immunglobulin) zwischen zwei Antikörpern gebunden wird.

Im Folgenden wird der genaue Versuchsablauf beschrieben:

1. Auf einer inerten 96 well-Polysorp-Platte (NUNC) wurde je 100 µl des Erstantikörpers in einer Verdünnung von 1:100 in 1x PBS (Gibco BRL) über Nacht bei 4°C fixiert. Die Platte wurde während jeglicher Inkubationszeiten mit einer Klebefolie (Fasson) versiegelt. Als Erstantikörper wurde beim Nachweis von Maus-Ig ein Ziege-Anti-Maus IgA+IgG+IgM, beim Nachweis von humanem Ig ein Ziege-Anti-Human IgA+IgG+IgM (beide Kirkegaard & Perry) eingesetzt. Die Platte wurde anschließend zweimal mit 250 µl 1x PBS + 0,05 % Tween (Biorad) und einmal mit 250 µl 1x PBS gewaschen, um die nicht adsorbierten Antikörper zu entfernen.



2. Nach Ausschlagen der Waschflüssigkeit wurde jede Vertiefung mit 200 µl Blockierpuffer (1x PBS + 5% Milchpulver (Biorad)) 1h bei RT auf dem Schüttler blockiert.



3. Nach Ausschlagen des Blockierpuffers wurden die Vertiefungen in Zweifachansätzen mit je 100 µl der verdünnten Serumprobe bzw. mit 100 µl eines verdünnten Standards (Maus IgG bzw. Human IgG, Reagent Grade, Sigma) befüllt. Nach einer Inkubationsdauer von 2 h bei RT auf dem Schüttler wurde die Platte wie unter 1. gewaschen.



4. Als Zweitantikörper wurde Biotin-markiertes Ziege-Anti-Maus IgA+IgG+IgM bzw. Biotin-markiertes Ziege-Anti-Human IgA+IgG+IgM (beide Kirkegaard & Perry) verwendet. In jede Vertiefung wurden 100 µl der Antikörperverdünnung gegeben, dann wurde die Platte 2 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Der sich anschließende Waschgang entspricht demjenigen unter 1.



5. Phosphatase-markiertes Streptavidin (Kirkegaard & Perry) wurde eingesetzt, um die Sensitivität der Methode zu erhöhen, da ein Biotinmolekül jeweils vier Streptavidinmoleküle binden kann. Es wurde in einer Konzentration von 0,25 µg/ml in einer Menge von jeweils 100 µl pro Well verwendet. Nach 2 h Inkubation bei RT auf dem Schüttler wurde wie unter 1. gewaschen.



6. Als Substrat wurde pNPP (Kirkegaard & Perry) eingesetzt, welches in Aqua dest. + 20 % DEA-Buffer (Kirkegaard & Perry) in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst wurde. Jede Vertiefung wurde mit 100 µl der Substratlösung befüllt. Anschließend konnte die Platte im ELISA-Reader (Spectra MAX 250, MWG-Biotech, mit Softmax Pro Data Analysis 1.0 auf Power Macintosh) ausgewertet werden.

2.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)

Zum Nachweis humaner DG3-spezifischer Antikörper in den Mausseren wurde eine indirekte Immunfluoreszenzuntersuchung an 7 µm dicken Gefrierschnitten von Affenösophagus (African Green Monkey, zur Verfügung gestellt von Covance, Münster) durchgeführt.

Die Affenösophagusschnitte wurden einen Tag lang auf Objektträgern luftgetrocknet und anschließend mit einem Fettstift (SCI Science Services) umkreist. Auf die Schnitte wurde jeweils 50 µl SCID-Mausserum in einer Verdünnung von 1:5 in 1x PBS (Gibco BRL) + 5% Rinderalbumin (Kirkegaard & Perry) gegeben, danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation in einer feuchten Kammer bei RT. Anschließend wurden die Schnitte 3x für 5 min mit Coons-

Puffer gewaschen. Der Coons-Puffer wurde in der Apotheke des Klinikums der RWTH Aachen hergestellt und setzte sich folgendermaßen zusammen:

Na-Barbital 4,12 g

NaCl 17,0 g

Aqua dest. ad 1000 ml

pH-Wert mit 1 N HCl auf pH 7,3 eingestellt.

Als Zweitantikörper wurde FITC-konjugiertes anti-Human IgG (Sigma) verwendet. Er wurde 1:100 in PBS + 5% Rinderalbumin verdünnt und dann in einer Menge von 50 µl auf die Schnitte gegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT in der feuchten Kammer wurden die Präparate 3x mit Coons-Puffer gewaschen, vorsichtig getrocknet und mit einem Tropfen Fluoprep (bioMérieux) überschichtet. Anschließend wurde, unter Vermeidung des Einschlusses von Luftblasen, ein Deckglas aufgelegt. Die Präparate wurden anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Deutschland) begutachtet und fotografiert.

2.4.3 Direkte Immunfluoreszenz (DIF)

Die entnommenen Organe wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C in Gefriermedium aufbewahrt. Gefrierschnitte (Dicke: 7 µm) wurden in einem Kryotom (Microm) angefertigt und anschließend 24 h bei RT luftgetrocknet, bis zur Immunfluoreszenzuntersuchung erfolgte die Lagerung bei -20°C.

Zur Untersuchung wurden die Schnitte aufgetaut und mit einem Fettstift (SCI Science Services) umkreist. Auf jeden Schnitt wurde je 50 µl des verdünnten Antikörpers (FITC-konjugiertes anti-Human IgG, Sigma) gegeben. Die Antikörper wurden 1:50 in Coons-Puffer + 4% Rinderalbumin (Kirkegaard & Perry) verdünnt. Die Schnitte wurden dann für 20 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend erfolgte die Spülung mit Coons-Puffer (1:1 mit H₂O verdünnt) jeweils 3x für 5 min. Mit einem Tropfen Fluoprep (bioMérieux) und Auflegen eines Deckglases wurden die Schnitte im Anschluß daran versiegelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet und fotografiert.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis des rekombinanten DG3

Das rekombinante Desmoglein 3 wurde qualitativ mit einem Western Blot nachgewiesen. Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte, wie oben beschrieben, nach der Methode von Lowry.

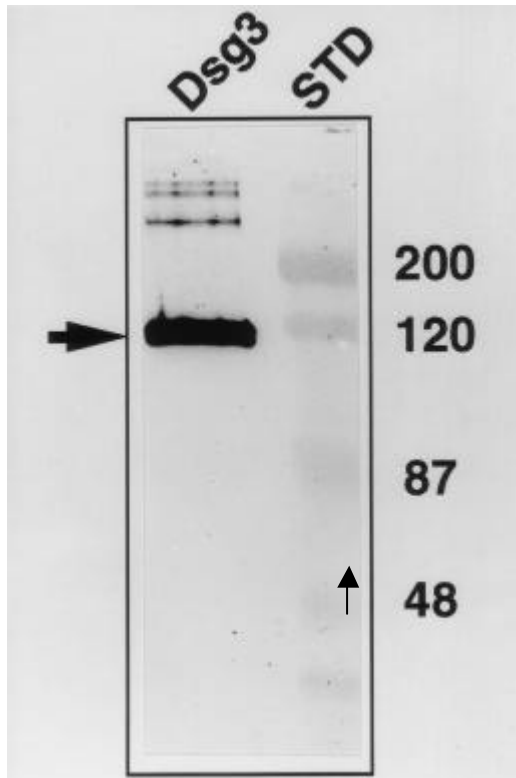


Abb. 3.1: Qualitativer Nachweis von rekombinantem Desmoglein 3 im Western Blot.

3.2 Nachweis von murinem Immunglobulin im Mausserum („Leaky“-Test)

Mit diesem ELISA-Verfahren wurde die Konzentration an Maus-Immunglobulin im *SCID*-Mausserum am Tag 0 vor Versuchsbeginn bestimmt.

Die einzelnen Versuchsgruppen setzten sich wie folgt zusammen:

Mäuse der Gruppen 1-3 erhielten eine Injektion von PBL eines gesunden Spenders, der Träger eines nicht PV-assoziierten HLA-Klasse-II-Allels ist. Dabei erhielt Gruppe 1 unbehandelte PBL, Gruppe 2 erhielt mit DG3 vorinkubierte PBL, Gruppe 3 erhielt PBL, die mit einem irrelevanten Baculoprotein vorinkubiert worden waren.

Mäuse der Gruppen 4-6 erhielten eine Injektion von PBL des gesunden Spenders mit PV-assoziiertem HLA-Genotyp. Gruppe 4 erhielt unbehandelte PBL, Gruppe 5 erhielt mit DG3 vorinkubierte PBL, Gruppe 6 erhielt mit dem irrelevanten Baculovirus-Protein inkubierte PBL.

Mäuse der Gruppen 7 und 8 erhielten PBL eines HLA-DR β 1*0402-positiven PV-Patienten. Gruppe 7 erhielt unbehandelte PBL, Gruppe 8 erhielt mit DG3 vorinkubierte PBL.

Die Mäuse der Gruppen 9 und 10 erhielten PBL eines gesunden Spenders, der Träger des HLA-Klasse II-Allels DR β 1*0402 ist. Die Mäuse beider Gruppen erhielten unbehandelte PBL, die Mäuse erhielten jedoch eine dreimalige Boosterung durch intraperitoneale PVHis-Injektionen an den Tagen 14, 21 und 42.

Die Mäuse der Gruppen 11 und 12 erhielten PBL des PV-Patienten. Die Mäuse beider Gruppen erhielten unbehandelte PBL, wie in den Gruppen 9 und 10 erhielten die Mäuse jedoch an den Tagen 14, 21 und 42 eine intraperitoneale Booster-Injektion mit je 20 μ g PVHis.

Die Ergebnisse sind gruppenweise in Tabellen im Anhang wiedergegeben. Drei Tiere wiesen einen geringfügig erhöhten murinen Immunglobulinspiegel zwischen 5,1-5,6 μ g/ml auf.

3.3 Nachweis von humanem Immunglobulin in Mausseren mittels ELISA

Mittels ELISA wurde in den Seren der *SCID*-Mäuse nach Injektion menschlicher Lymphozyten die Konzentration menschlicher Immunglobuline bestimmt.

Die einzelnen Gruppen sind unter Punkt 3.2 bereits definiert (Tabellen: siehe Anhang).

Abb. 3.2-3.13: Humanimmunglobulinspiegel in *SCID*-Mausseren

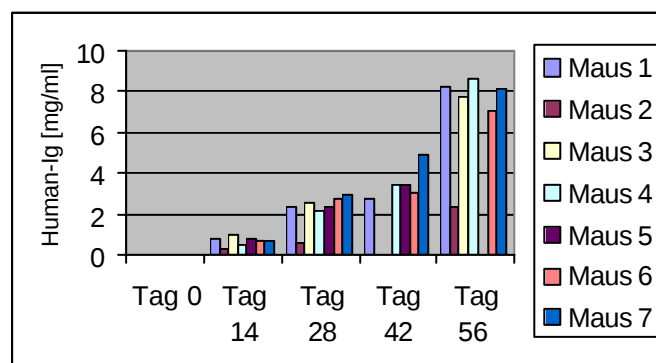


Abb. 3.2: Gruppe 1

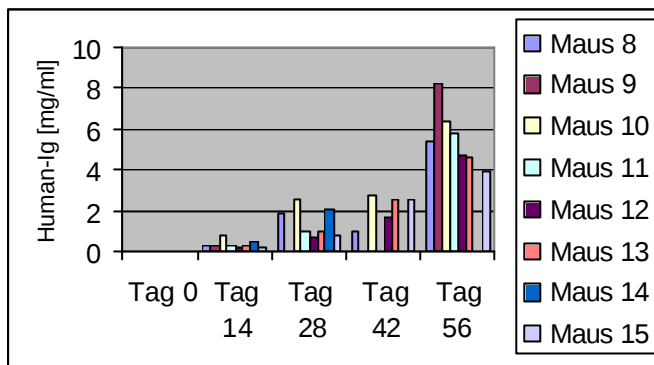


Abb. 3.3: Gruppe 2

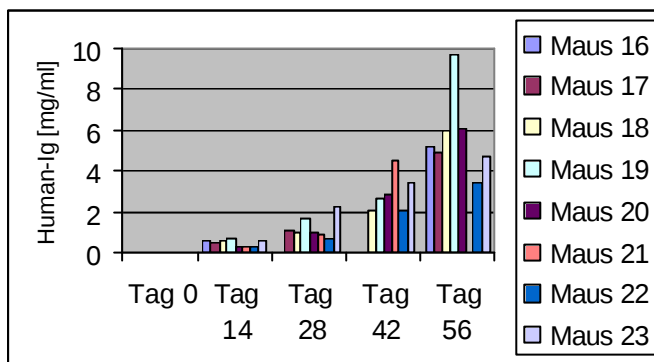


Abb. 3.4: Gruppe 3

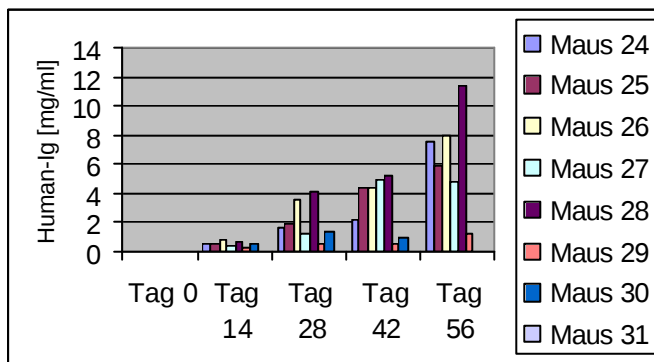


Abb. 3.5: Gruppe 4

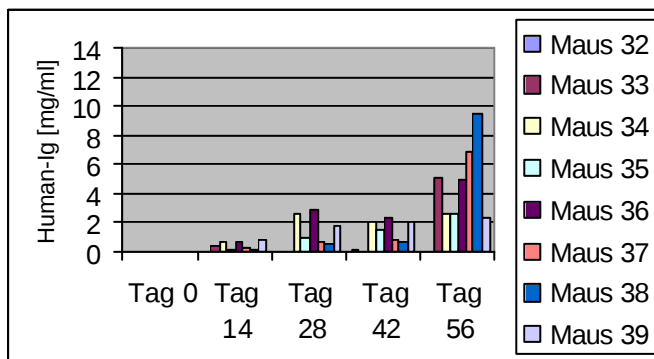


Abb. 3.6: Gruppe 5

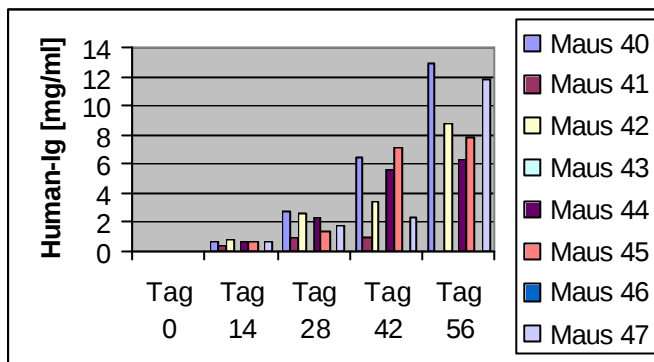


Abb. 3.7: Gruppe 6

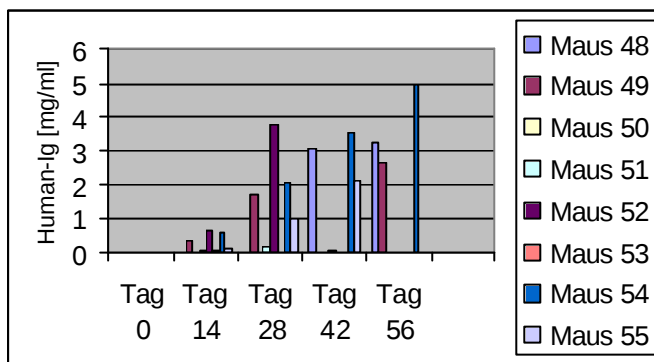


Abb. 3.8: Gruppe 7

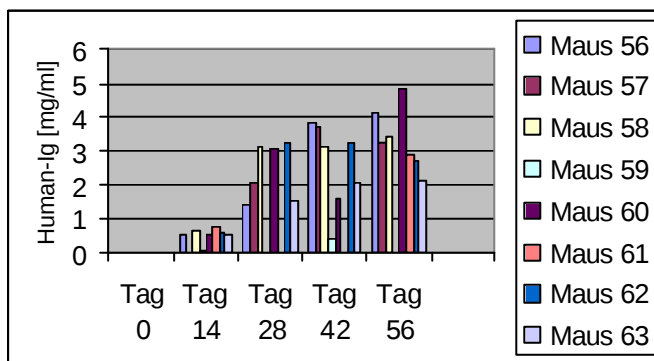


Abb. 3.9: Gruppe 8

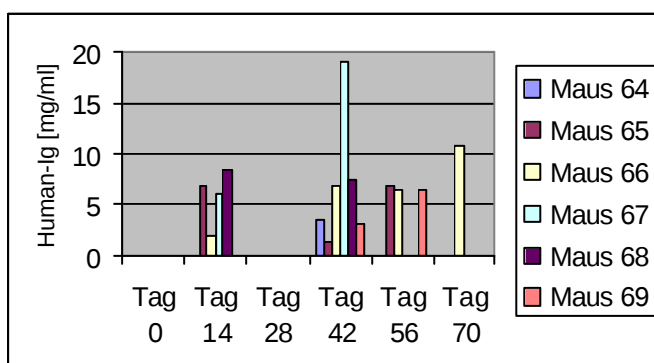


Abb. 3.10: Gruppe 9

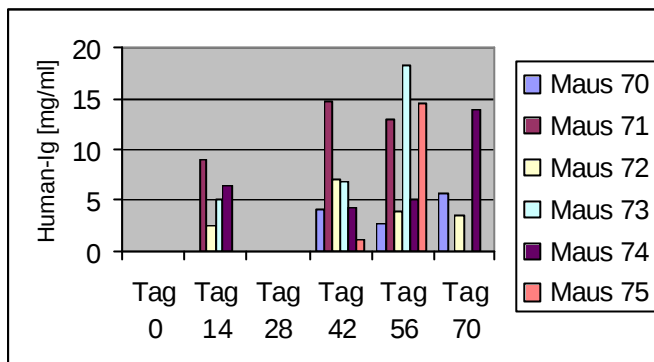


Abb. 3.11: Gruppe 10

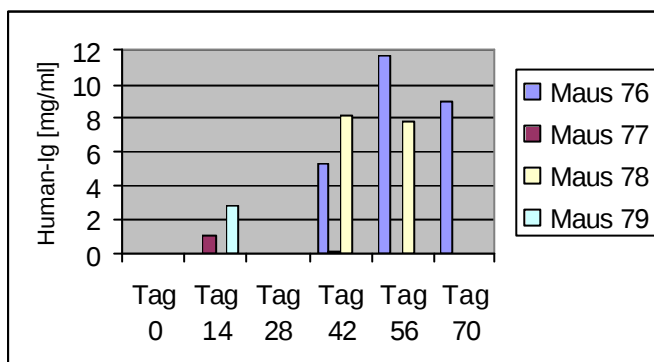


Abb. 3.12: Gruppe 11

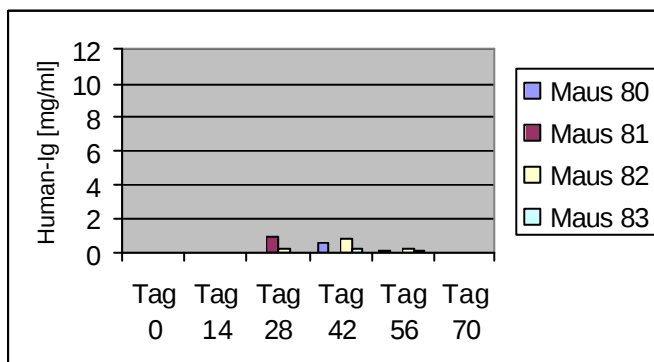


Abb. 3.13: Gruppe 12

3.4 Nachweis humaner antidesmosomaler Antikörper im Mausserum mittels indirekter Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) auf Affenösophagus zum Nachweis zirkulierender humaner antidesmosomaler Antikörper in *SCID*-Mausseren lieferte bis auf ein Mausserum negative Ergebnisse, d.h. es war kein interzelluläres Fluoreszenzmuster erkennbar. Das Serum

von *SCID*-Maus Nr. 76 aus Gruppe 11 führte in der IIF zu einer interzellulären Fluoreszenz um die Basalzellen des Affenösophagusepithels herum. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung sichtbar.

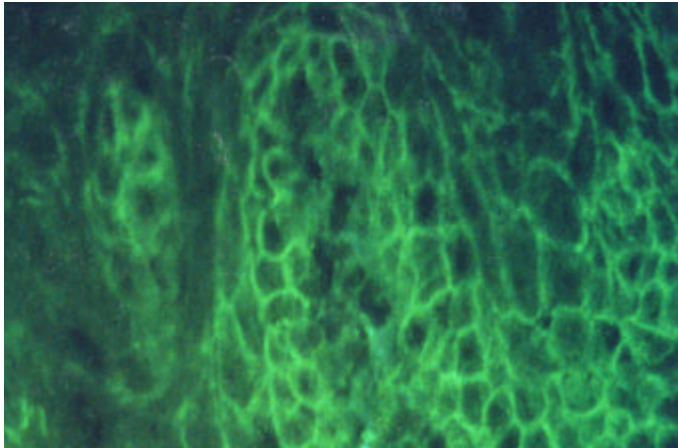


Abb. 3.14 Typisches interzelluläres Fluoreszenzmuster humaner Autoantikörper auf Affenösophagus

3.5 Nachweis gewebegebundener humaner Autoantikörper in *SCID*-Mäusen nach PBL-Injektion

Die Untersuchung verschiedener Mausgewebe auf gewebsgebundene antidesmosomale humane Antikörper durch die direkte Immunfluoreszenz (DIF) lieferte negative Ergebnisse. Lediglich die Untersuchung der Zunge von Maus Nr. 76 in der DIF ergab einen positiven Befund im Sinn einer interzellulären Fluoreszenz. Der Befund ist in der folgenden Abbildung zu sehen.

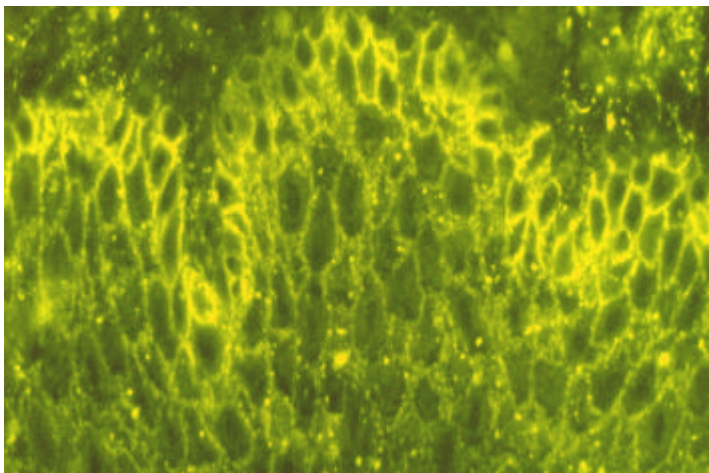


Abb. 3.15: Gewebegebundene humane IgM-Antikörper mit dem PV-typischen interzellulären Fluoreszenzmuster

4 Diskussion

4.1 Pemphigus vulgaris und bisherige Therapieoptionen

Die genauen pathogenetischen Details der Entwicklung des Pemphigus vulgaris (PV) sind bislang nicht ausreichend erforscht. Aus diesem Grund ist zur Zeit auch keine kausale Therapie bekannt. Die bisherigen Behandlungsmöglichkeiten beschränken sich, wie bei zahlreichen anderen Autoimmunerkrankungen, vornehmlich auf den Einsatz von Glukokortikoiden und zusätzlicher Immunsuppressiva (Azathioprin, Cyclophosphamid u.a.). Es bestehen daneben auch bislang meist experimentelle Behandlungsstrategien, die auf eine Verminderung der autoaggressiven T-Zellen bzw. der pathogenen Autoantikörper abzielen.

Bei der Immunapherese wird das Blut des Patienten, vergleichbar der Dialyse bei Nierenversagen, außerhalb des Körpers durch Passage über spezifische Oberflächen von bestimmten Plasmaproteinen befreit. Nach der Auftrennung in Blutzellen und –plasma fließt das Blutplasma über einen z.B. phenylalanin- oder tryptophanbeschichteten Adsorber, an den (Auto-)Antikörper und andere Plasmaproteine binden. Das auf diese Art gereinigte Plasma wird mit den Blutzellen zusammen dem Patienten wieder zugeführt (Spaethe et al 1993). Bislang erfolgt die Entfernung der Antikörper unspezifisch, neuere Entwicklungen gehen aber dorthin, eine spezifische Behandlung anzubieten, bei der nur die jeweiligen Autoantikörper entfernt werden. Durch die Immunapherese werden die Titer zirkulierender Autoantikörper signifikant reduziert, wodurch das Entzündungsgeschehen deutlich vermindert wird.

Bei der extrakorporalen Photopherese handelt es sich um eine extrakorporale Photoimmuntherapie in Kombination mit einer oralen Einnahme des Photochemotherapeutikums 8-Methoxypsoralen (8-MOP). 8-MOP wird durch Bestrahlung mit Ultraviolettlicht (UVA-Licht) aktiviert und bildet Photoaddukte mit DNA und RNA und hemmt damit die DNA-Replikation bzw. Proteinsynthese. Seit einigen Jahren wird die extrakorporale Photopherese in der Therapie T-Zell-vermittelter Erkrankungen eingesetzt (Gasparro 2000, Oliven et al 2001). Das Blut wird mittels einer Zentrifuge aufgetrennt, leukozytenangereichertes Blutplasma (der sog. "Buffy Coat") gesammelt und in einem extrakorporalen Kreislauf einer kontrollierten UV-A-Bestrahlung ausgesetzt. Die Gesamtdauer der Behandlung beträgt ca. 3,5 h. Im Anschluß an die Bestrahlung werden die UV-A-bestrahlten Lymphozyten dem Patienten reinfundiert.

Da diese Therapieformen nur symptomatisch wirken und keine definitive Heilung herbeiführen, müssen sie häufig über einen längeren Zeitraum eingesetzt werden, was zum Auftreten schwerer unerwünschter Nebenwirkungen, beispielsweise opportunistischer Infektionen, führen kann. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, neue Therapien zu

entwickeln, die einen kausalen Ansatz verfolgen und weniger unerwünschte Wirkungen verursachen.

4.2 Neue Therapieansätze und Notwendigkeit eines *in vivo*-Modells

Der zur Zeit erfolgversprechendste Ansatz ist in einer Therapie zu suchen, die keine allgemeine Immunsuppression zum Ziel hat, sondern spezifisch an immunologischen Regelmechanismen ansetzt. Ein möglicher Angriffspunkt ist die Interaktionsstelle zwischen CD4-positiven T-Lymphozyten und den antigenpräsentierenden Zellen. Dabei erkennen CD4-positive T-Zellen ihr Antigen durch Interaktion mit einem Komplex aus T-Zell-Rezeptor, CD4-Korezeptor und HLA-Klasse-II-Protein.

Damit ein Antigenpeptid einer T-Zelle erfolgreich präsentiert werden kann, muss es zwei Bedingungen erfüllen: Ein Teil des Peptids muss an das präsentierende HLA-Klasse-II-Protein binden können und ein anderer Teil des Peptids muss von dem jeweiligen T-Zellrezeptor erkannt werden; letzterer Teil wird auch als immundominantes Epitop bezeichnet. Es ist bekannt, dass die Modifizierung eines einzigen Aminosäurerests in einem solchen Epitop das betreffende agonistische Peptid in ein „antagonistisches“ T-Zellpeptid verwandeln und die Präsentation eines solchen modifizierten Antigens durch antigenpräsentierende Zellen zur T-Zellanergie führen kann (Janeway 2001). Durch *in vitro*-Untersuchungen konnten Aminosäuresequenzen der extrazellulären Domäne des DG3 bestimmt werden, die als immundominante Epitope in Frage kommen (Hertl et al 1995 und 1996). Diese Epitope müssten nach einer Modifizierung *in vitro* auf ihre Fähigkeit zur Auslösung einer T-Zellanergie geprüft werden, um die wirksamsten Aminosäureveränderungen zu bestimmen. Im Anschluß an die *in vitro*-Prüfung muss die *in vivo*-Prüfung erfolgen. Bislang fehlte jedoch die Möglichkeit, die Wirksamkeit dieser veränderten Peptide in einem aktiven *in vivo*-Tiermodell zu überprüfen. Aus diesem Grund ist die Entwicklung eines solchen Modells ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu einer spezifischen Immuntherapie. Das Ziel einer derartigen Therapie wäre, durch Verabreichung modifizierter Peptide des DG3 bei den PV-Patienten eine Anergie DG3-autoreaktiver T-Zellen auszulösen.

4.2.1 Das humanisierte SCID-Mausmodell

Juhasz stellte ein Modell vor, das darin bestand, SCID-Mäuse mit Lymphozyten von PV-Patienten zu „humanisieren“, d.h. ihnen ein humanes Immunsystem von PV-Patienten zu implantieren. Bei 34 der von ihm untersuchten 49 Tiere ließen sich nach Transfer humaner Lymphozyten humane Immunglobuline in einer Konzentration $>0,1$ mg/ml nachweisen. Bei 20/34 dieser Tiere ließen sich zirkulierende antiepidermale Antikörper wie bei PV nachweisen. Nach experimentell induzierter Verletzung der Haut durch Kälte oder Hitze fand sich bei 44% dieser Tiere gewebegebundenes humanes IgG in der Epidermis. Zwölf Mäuse erhielten vor Übertragung der Lymphozyten allogene menschliche Haut transplantiert; bei 10 dieser 12 Tiere kam es dann zur PV-ähnlichen intraepidermalen Spaltbildung mit Ablagerung von humanem IgG in diesen Hauttransplantaten.

Kritikwürdig an dieser Arbeit erscheint, dass die IgG-Ablagerungen in der murinen Haut nicht spontan auftraten, sondern erst durch Kälte- und Hitzetraumata induziert wurden. Es ist schwierig zu beurteilen, ob diese Ablagerungen allein durch Affinität der humanen Antikörper für murine Epidermis oder auch überwiegend durch die Traumatisierung an sich verursacht sind. Der Zeitpunkt des Nachweises zirkulierender PV-Antikörper ist nicht benannt, ebenso fehlten die Angaben, ob im Laufe der Untersuchung PV-spezifische humane Autoantikörper mehrfach bestimmt wurden und ob die Konzentration dieser Antikörper stabil war bzw. Veränderungen unterworfen war. Gewebegebundene humane Immunglobuline in allogenen menschlichen Hauttransplantaten können außer durch Spezifität dieser Antikörper für epidermale Strukturen auch durch eine Gewebeunverträglichkeitsreaktion zwischen Patienten-PBL und Spenderhaut bedingt sein (Juhasz et al 1993).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, SCID-Mäuse mit den Lymphozyten eines PV-Patienten und zweier HLA-kompatibler bzw. inkompatibler gesunder Spender zu „humanisieren“. Lymphozyten der Spender wurden teilweise mit dem Autoantigen DG3 stimuliert, entweder vor oder nach dem Transfer in die SCID-Mäuse. Damit sollte erreicht werden, dass die Produktion von Autoantikörpern gegen DG3 verstärkt bzw. induziert wird. Des weiteren sollte untersucht werden, ob in diesem *in vivo*-Modell Lymphozyten von gesunden Trägern PV-assoziiierter HLA-Allele zur Produktion PV-spezifischer Antikörper angeregt werden können.

Von den untersuchten Tieren wiesen lediglich drei im „Leaky“-Test nachweisbare murine Immunglobuline auf (5,1-5,6 μ g/ml).

Humane Immunglobuline ließen sich, mit einer Ausnahme, in den Seren aller Tiere ab dem Tag 14 nach Injektion humaner Lymphozyten nachweisen. Das einzige Tier, bei dem dies

nicht der Fall war, verstarb bereits vor der Blutabnahme am Tag 14. Die Konzentrationen an menschlichen Immunglobulinen nahmen im Verlauf der Untersuchung kontinuierlich zu, mit Maximalwerten von 19,1 mg/ml bei Maus 67 an Tag 42 und von 18,46 mg/ml bei Maus 73 an Tag 56. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen waren keine nennenswerten Unterschiede zu erkennen. Lediglich bei Gruppe 12 erreichte kein Tier einen Human-Immunglobulinspiegel >1 mg/ml. Die Gründe hierfür sind unklar, da die Tiere der Gruppe 11 ebenfalls PBL des PV-Patienten erhielten und mit DG3 nach Transfer geboostert wurden, aber deutlich höhere Immunglobulinspiegel von bis zu 11,86 mg/ml erreichten. Insgesamt lässt sich sagen, dass bei allen Tieren, bei denen ab Tag 14 nach Zelltransfer Serumuntersuchungen stattfanden, substantielle Mengen von humanem Immunglobulin nachweisbar waren. Dies deutet auf ein funktionsfähiges Überleben der menschlichen Lymphozyten hin.

Sowohl in der indirekten Immunfluoreszenzuntersuchung (IIF) der Mausseren als auch in der direkten Immunfluoreszenzuntersuchung (DIF) von Mausgewebe fanden sich zirkulierende bzw. gewebegebundene humane Autoantikörper nur bei einer Maus, die Patientenlymphozyten erhalten hatte und nach Transfer mit DG3 geboostert worden war. In der IIF war ein interzelluläres Fluoreszenzmuster zu sehen, was auf das Vorliegen zirkulierender humaner antiepidermaler Antikörper schließen lässt. Die DIF der Mäusezunge ergab ebenfalls ein interzelluläres Fluoreszenzmuster, das durch gewebsgebundene humane Antikörper verursacht wurde. Die Homologie zwischen humanem und murinem DG3 beträgt 85,6%, wodurch die Affinität der gewebsgebundenen humanen Antikörper für murines DG3 erklärt wird (Ishikawa et al 2000). Somit konnte nur bei einer Maus, die Patienten-PBL erhalten hatte, ein Befund erhoben werden, der demjenigen bei PV ähnelt, obwohl bei dem Patienten zirkulierende PV-Antikörper nachgewiesen worden waren. Bei den Mäusen, die PBL gesunder Spender erhalten hatten, waren die Immunfluoreszenzuntersuchungen durchweg negativ, unabhängig davon, ob ein PV-assoziiertes HLA-Allel vorlag oder nicht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in diesem Modell der humanisierten *SCID*-Maus die übertragenen humanen PBL auch nach Transfer funktionell waren und steigende Mengen humanen Immunglobulins produzierten, jedoch nur in einem Fall PV-spezifische humane Antikörper nachgewiesen werden konnten. Die Effizienz des Modells erscheint aufgrund dieser Ergebnisse gering. Die serologischen und immunhistologischen Merkmale des PV konnten nur in einer einzigen Patienten-PBL-Maus reproduziert werden. PBL gesunder Spender konnten in diesem *in vivo*-Modell nicht zur Produktion antidesmosomaler Antikörper angeregt werden (Rädisch et al 2002).

Einige mögliche Ursachen sollen im Folgenden angesprochen und diskutiert werden.

Maus 76, bei der serologisch wie immunhistologisch positive Befunde erhoben werden konnten, hatte PV-PBL erhalten, die nach Transfer wiederholt mit dem Autoantigen DG3 stimuliert wurden. Vermutlich ist die Effizienz immunologischer Stimuli nach Transfer zeitabhängig und nimmt mit Beginn der dritten Woche ab. Der Grund soll die übermäßige Stimulation der PBL durch die zahlreichen Xenoantigene sein, denen sie im murinen Organismus ausgesetzt sind. Dieser Vorgang wurde auch als Xenoaktivierung bezeichnet und soll die Ansprechbarkeit der PBL für neue Antigene einschränken (Albert et al 1997). Möglicherweise hat dieser Mechanismus das Ansprechen der PBL auf das injizierte DG3 reduziert.

PBL, die vor Zelltransfer mit dem Autoantigen DG3 inkubiert wurden, waren während dieser Zeit einer relativ hohen Konzentration des Autoantigens ausgesetzt. Dies könnte zur Folge haben, dass dies auf die Zellen eine toxische Wirkung hat oder dass autoreaktive T-Zellen durch hohe *in vitro*-Konzentration von DG3 eine DG3-spezifische Toleranz entwickelten (Janeway 2001). Dies würde die fehlende Produktion von PV-Autoantikörpern in den Gruppen 1 bis 8 erklären helfen.

Da es sich bei dem hier vorgestellten *SCID*-Mausmodell um eine Chimäre aus Maus und Mensch handelt, befinden sich die menschlichen PBL natürlich in einem Milieu, in dem sie neuen und völlig andersartigen Bedingungen ausgesetzt sind. Einflüsse durch murine Zytokine, murine Xenoantigene und eine nicht physiologische Zusammensetzung der überlebenden Lymphozytenpopulation lassen sich schwer einschätzen und stellen eine große Anzahl von unbekannten Faktoren dar. Dies alles könnte für die geringe Reproduzierbarkeit der serologischen wie immunhistologischen PV-Pathologie mitverantwortlich sein. Bei der Bewertung dürfen auch die auftretenden praktischen Schwierigkeiten nicht unerwähnt bleiben. So ist PV eine relativ seltene Erkrankung. Noch seltener sind unbehandelte Patienten. Da die meisten Patienten unter immunsuppressiver Behandlung stehen, besteht die Gefahr, dass die Lymphozyten aus diesem Grund im *SCID*-Mausmodell nicht überleben und genügend Antikörper produzieren. Der Patient, von dem die hier verwendeten Lymphozyten stammen, wurde zum Zeitpunkt der Blutspende jedoch nicht immunsuppressiv behandelt, sondern befand sich am Beginn eines akuten Krankheitsschubs. Eine weitere Schwierigkeit ist im Tiermodell der Maus zu sehen. Da eine Maus nur über ein Gesamtblutvolumen von etwa 1 ml verfügt, können Probleme bei der Blutabnahme auftreten. Wird zuviel Blut abgenommen (>150 µl), kann die Maus verbluten; wird dagegen zu wenig Blut abgenommen, steht für die Untersuchungen unter Umständen nicht genügend Material zur Verfügung, da bei einem

Hämatokrit von ca. 50% bei einer durchschnittlichen Abnahmemenge von 70-100 µl nur 35-50 µl Serum anfallen. Außerdem kann aus technischen Gründen nicht bei jedem Blutabnahmeversuch der Erfolg garantiert werden. Die Abnahmemöglichkeiten können durch postpunktionelle Verödung des retroorbitalen Venenplexus weiter eingeschränkt werden. Bei der Technik der intraperitonealen Injektion der PBL können ebenfalls Probleme auftreten. So können starke interindividuelle Unterschiede zwischen den Human-Immunglobulinspiegeln im Mausserum auch dadurch entstehen, dass aus technischen Gründen die Injektion nicht immer denselben Erfolg hat.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit dem hier vorgestellten Ansatz ein effizientes und zuverlässig reproduzierbares *in vivo*-Modell des PV nicht realisierbar erscheint. Es ist daher nötig, andere *in vivo*-Modelle zu erarbeiten und experimentell zu untersuchen. Einige solche Modelle, die bereits untersucht worden sind, werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

4.2.2 Andere Ansätze zur Etablierung eines *in vivo*-Modells

Neben der Methode der „Humanisierung“ von *SCID*-Mäusen gibt es weitere Ansätze, *in vivo*-Modelle des PV zu etablieren, die im Folgenden vorgestellt und bewertet werden sollen.

Zillikens und Mitarbeiter entwickelten ein Modell, das darin bestand, *SCID*-Mäusen menschliche Haut gesunder Spender zu transplantieren und den Mäusen im Anschluss daran aufgereinigtes IgG aus dem Serum von PV-Patienten zu injizieren. In der transplantierten Haut wurden subkorneale Blasenbildung sowie interzelluläre Ablagerungen von menschlichem IgG beobachtet. Es handelte sich bei dem beschriebenen Modell zwar um ein *in vivo*-Experiment. Da jedoch keine humanen Lymphozyten übertragen wurden und daher nach dem Transfer keine weitere (Auto-)Antikörperproduktion stattfindet, sind die Möglichkeiten einer Weiterentwicklung dieses Modells zur Therapieentwicklung relativ begrenzt (Zillikens et al 2001).

Die Arbeitsgruppe von Fan untersuchte vier verschiedene Mäusestämme (BALB/c, DBA/1, SJL/J und HRS/J), die mit rekombinantem humanen DG3 immunisiert wurden. In den Seren von Mäusen aller vier Stämme konnten anschließend murine Antikörper gegen humanes DG3 nachgewiesen werden, der höchste Titer fand sich bei den SJL/J-Mäusen, während die Titer bei den drei anderen Stämmen auf einem vergleichbar niedrigen Niveau blieben. Nur die in BALB/c-Mäusen erzeugten Antikörper gegen DG3 waren in der Lage, auf inkubierter menschlicher Haut eine Akantholyse zu erzeugen. Eine eindeutige Beziehung zwischen den Antikörper-Subtypen und der Pathogenität konnte nicht aufgezeigt werden. Die Autoren vermuten einen immungenetischen Hintergrund, der bei den BALB/c-Mäusen die Produktion

pathogenetisch wirksamer DG3-Antikörper ermöglicht, sie bei den drei anderen untersuchten Mäusestämmen aber verhindert (Fan et al 1999).

Der interessanteste und möglicherweise versprechendste Ansatz stammt von der Arbeitsgruppe von Amagai. Hier wurden Mäuse eingesetzt, bei denen das Gen für das Maus-DG3 ausgeschaltet ist, sogenannte Knockout-Mäuse. Aufgrund der fehlenden natürlichen Toleranz gegen DG3 wurden diese DG3(-/-)Mäuse zur Induktion eines aktiven Tiermodells des PV eingesetzt. DG3(-/-)Mäuse wurden mit rekombinantem murinem DG3 (mDG3) immunisiert. Da diese Tiere kein mDG3 exprimieren, kann ihr Immunsystem in der Entwicklungsphase keine Toleranz gegen dieses Antigen entwickeln. Aus diesem Grund wird das injizierte mDG3 als Fremdanigen betrachtet und führt zur Produktion von für mDG3 spezifischem IgG. Bei allen immunisierten Tieren konnte IgG gegen mDG3 nachgewiesen werden, welches auf inkubierten murinen Keratinozyten zur interzellulären Antikörperablagerung führte. Den immunisierten DG3(-/-)Mäusen wurden Splenozyten entnommen und *Rag2*(-/-)Mäusen transplantiert. Diesen *Rag2*(-/-)Mäusen fehlt das „Recombination activation gene 2“, welches für die Rekombination der V(D)J-Segmente der T-Zellrezeptor- und Immunglobulingene zuständig ist (Shinkai 1992). Die sich daraus ergebende Immundefizienz verhindert ein Abstoßen von Allotransplantaten bei den betreffenden Tieren. Daher konnten die den immunisierten DG3(-/-)Mäusen entnommenen Splenozyten in den *Rag2*(-/-)Mäusen ein funktionsfähiges Immunsystem ausbilden. Die weiterhin produzierten Antikörper gegen mDG3 lagerten sich in der Epidermis der *Rag2*-defizienten Mäuse ab, da diese mDG3 exprimieren. Phänotypisch zeigte sich bei den betroffenen Mäusen ein teilweiser Haarverlust sowie Erosionen der oralen Mukosa mit dadurch bedingter nachfolgender Einschränkung der Nahrungsaufnahme. Die Schwere des Befalls konnte durch den Gewichtsverlust bestimmt werden. Die Konzentration der anti-DG3-Antikörper nahm nach dem Splenozytentransfer kontinuierlich zu und erreichte am Tag 21 einen Plateauwert. Für den untersuchten Zeitraum von 6 Monaten blieb sie stabil. Bei allen 18 untersuchten *Rag2*-defizienten Mäusen ließen sich *in vivo* IgG-Ablagerungen auf Keratinozyten nachweisen, bei 15 der 18 Tiere fand sich histologisch eine Akantholyse der Mundschleimhaut.

In diesem Modell wurde das Problem der möglichen Autoantigentoleranz durch den Einsatz von Knockout-Mäusen umgangen. Zudem wurden die transplantierten Lymphozyten in Organismen der gleichen Spezies untersucht, so dass die mögliche Fehlerquelle einer Reaktion auf Xenoantigene ausgeschlossen wurde. Da es sich bei Spender und Empfänger der Lymphozyten um die gleiche Spezies und nicht um eine Chimäre aus menschlichen

Lymphozyten und tierischem Organismus handelt, ist das System vermutlich weniger störungsanfällig. Die Erprobung immunmodulatorischer Therapien sollte in einem solchen Modell zuverlässiger gelingen. Allerdings ist zu bedenken, dass diese Erkenntnisse in einem komplett murinen System gewonnen würden und nicht unmittelbar auf den PV des Menschen übertragbar wären (Amagai et al 2000).

4.3 Ausblick

Die Etablierung aktiver Tiermodelle, insbesondere mit Autoantigen-defizienten (sogenannten Knock-out)-Tieren, könnte detailliertere Erkenntnisse über die Pathophysiologie von Autoimmunkrankheiten ermöglichen und die Erprobung experimenteller Therapieformen erlauben. In diesem Zusammenhang ist an die Untersuchung modifizierter Autoantigenpeptide bzw. hoher Autoantigendosen mit dem Ziel einer spezifischen T-Zell-Anergie und autoantigenspezifischer Toleranz zu denken.

In den letzten Jahren ist daneben ein ganz andersartiger Ansatz der Therapie von Autoimmunerkrankungen aufgezeigt worden, nämlich die autologe sowie die allogene Knochenmarks- und Stammzelltransplantation. Joske führte bei einem Patienten mit schwerer rheumatoider Arthritis eine autologe Knochenmarkstransplantation durch, die bei dem Patienten zu einer deutlichen Verbesserung des Gesundheitszustandes führte. Die autologe Stammzelltransplantation birgt jedoch das Risiko, dass sich aus den Stammzellen, die dem Patienten entnommen werden, bevor sein Immunsystem mit hochdosierten Chemotherapeutika zerstört wird, die autoaggressiven Lymphozyten erneut bilden. Der Vorteil der autologen Transplantation ist die gute Gewebeverträglichkeit. Die allogene Stammzelltransplantation hingegen weist ein viel geringeres Risiko des Wiederauftretens der Autoimmunkrankheit auf, dafür ist die Gewebeverträglichkeit je nach HLA-Übereinstimmung problematisch, was zur Ausbildung eines „Graft-versus-Host-Disease“ führen kann. Da beide Methoden sehr risikoreich sind und den Patienten kurzzeitig einer extremen Infektionsgefahr aussetzen, ist eine sehr sorgfältige Risiko-Nutzen-Abwägung notwendig. Bislang sind außer bei Patienten mit rheumatoider Arthritis auch bei Patienten mit multipler Sklerose, Lupus erythematosus und Sklerodermie solche Therapieversuche unternommen worden. Ob diese Methode auch für Patienten mit Pemphigus vulgaris in Frage kommt, muss noch weiter untersucht werden (Joske et al 1997, Tyndall et al 1999, Nash 2000).

5 Zusammenfassung

Pemphigus vulgaris (PV) ist eine schwere blasenbildende, durch Autoantikörper gegen das epidermale Adhäsionsprotein Desmoglein 3 (DG3) vermittelte Hauterkrankung. Die zellulären Mechanismen bei der Induktion und Perpetuierung der Antikörperproduktion in der Pathogenese des PV sind noch nicht ausreichend bekannt. Es besteht eine Assoziation mit bestimmten HLA-Klasse-II-Allelen.

Ziel der Arbeit war die Etablierung eines *in vivo*-Modells, um die Rolle autoreaktiver T-Lymphozyten bei der Regulation der Autoantikörperproduktion sowie die Bedeutung immungenetischer Faktoren bei der T-Zellaktivierung besser zu verstehen. Es wurde das Modell der immundefizienten SCID-Maus gewählt, in der durch Transfer menschlicher peripherer Blutlymphozyten (PBL) ein funktionsfähiges „humanisiertes“ Immunsystem etabliert werden kann. Zur Berücksichtigung der Rolle immungenetischer Faktoren (HLA) wurden PBL eines Patienten mit aktiver PV-Erkrankung und einer HLA-homologen gesunden Kontrollperson in SCID-Mäuse injiziert.

SCID-Mäuse wurden mit PBL eines PV-Patienten, einer HLA-homologen Kontrollperson sowie einer Kontrollperson mit bei PV nicht prävalentem HLA-Genotyp rekonstituiert. Die humanen PBL wurden entweder vor Injektion mit affinitätschromatographisch aufgereinigtem, rekombinantem DG3 inkubiert oder nach Transplantation mehrfach durch intraperitoneale Injektion von DG3 immunisiert. Humanes Immunglobulin konnte nach acht Wochen in substantiellen Mengen in allen untersuchten Mausseren nachgewiesen werden, was ein Hinweis auf die erfolgreiche Induktion eines humanisierten *in vivo*-Systems war. In der Tat fanden sich im Serum einer mit PV-Patienten-PBL rekonstituierten SCID-Maus humane antidesmosomale Antikörper der IgM-Klasse sowie antidesmosomales humanes IgM in der Haut und im Zungenepithel. Bei den anderen humanisierten SCID-Mäusen fanden sich keine humanen Autoantikörper gegen DG3, ebenso wenig bei SCID-Mäusen, die PBL von HLA-homologen bzw. -heterologen gesunden Probanden erhalten hatten.

Obwohl der in dieser Arbeit gewählte Versuchsansatz in 100% der untersuchten SCID-Mäuse zur erfolgreichen Etablierung eines humanisierten *in vivo*-Modells führte, ist die Effizienz des untersuchten *in vivo*-Modells für die Induktion humaner Autoantikörper gegen DG3 als zu niedrig anzusehen. Ursächlich hierfür sind möglicherweise die niedrige Frequenz autoreaktiver T-Zellen im peripheren Blut der Patienten, eine Überaktivierung der humanen PBL durch murine Xenoantigene mit nachfolgender Anergie sowie eine mögliche toxische Wirkung des DG3 bei der *in vitro*-Stimulation der PBL während der Inkubation vor Zelltransfer oder während der Immunisierung unter *in vivo*-Bedingungen.

Anhang:

Murine Immunglobulinspiegel („Leaky“-Test)

Gruppe 1	Maus-Ig [µg/ml]
Maus-Nr.	Tag 0
1	1,1
2	0,78
3	0,99
4	2,29
5	0,99
6	1,54
7	0,65

Gruppe 2	Maus-Ig [µg/ml]
Maus-Nr.	Tag 0
8	1,29
9	1,89
10	0,85
11	1,69
12	1,64
13	0,65
14	1,09
15	3,15

Gruppe 3	Maus-Ig [µg/ml]
Maus-Nr.	Tag 0
16	0,79
17	5,24
18	1,34
19	0,99
20	5,09
21	0,74
22	2,05
23	0,75

Gruppe 4	Maus-Ig [µg/ml]
Maus-Nr.	Tag 0
24	1,49
25	1,63
26	1,51
27	1,19
28	1,59
29	1,49
30	1,47
31	1,39

Gruppe 5	Maus-Ig [µg/ml]
Maus-Nr.	Tag 0
32	1,29
33	1,27
34	1,53
35	5,59
36	1,59
37	1,83
38	1,43
39	2,57

Gruppe 6	Maus-Ig [µg/ml]
Maus-Nr.	Tag 0
40	1,71
41	1,37
42	2,01
43	1,67
44	1,79
45	1,41
46	2,23
47	2,43

Gruppe 7	Maus-Ig [µg/ml]
Maus-Nr.	Tag 0
48	1,43
49	1,43
50	1,31
51	1,59
52	1,71
53	1,41
54	1,83
55	1,51

Gruppe 8	Maus-Ig [µg/ml]
Maus-Nr.	Tag 0
56	1,25
57	1,23
58	1,65
59	2,65
60	2,13
61	2,87
62	4,07
63	1,71

Gruppe 9	Maus-Ig [µg/ml]
Maus-Nr.	Tag 0
64	1,37
65	1,93
66	2,74
67	1,05
68	1,77
69	2,95

Gruppe 10	Maus-Ig [µg/ml]
Maus-Nr.	Tag 0
70	2,91
71	3,89
72	1,56
73	4,21
74	1,2
75	1,73

Gruppe 11	Maus-Ig [µg/ml]
Maus-Nr.	Tag 0
76	0,83
77	1,81
78	1,24
79	1,58

Gruppe 12	Maus-Ig [µg/ml]
Maus-Nr.	Tag 0
80	1,09
81	1,19
82	1,61
83	1,21

Humane Immunglobulinspiegel in den Mausseren

Gruppe 1		Human-Ig [mg/ml]			
Maus-Nr.	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 42	Tag 56
1	0	0,768	2,328	2,812	8,307
2	0	0,277	0,531		2,307
3	0	0,955	2,595		7,796
4	0	0,484	2,106	3,368	8,626
5	0	0,791	2,306	3,405	
6	0	0,717	2,75	3,012	7,073
7	0	0,615	2,906	4,879	8,115

Gruppe 2		Human-Ig [mg/ml]			
Maus-Nr.	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 42	Tag 56
8	0	0,304	1,839	0,945	5,477
9	0	0,275			8,222
10	0	0,835	2,61	2,76	6,413
11	0	0,279	1,022		5,775
12	0	0,164	0,699	1,694	4,69
13	0	0,311	0,955	2,471	4,668
14	0	0,433	2,061		
15	0	0,204	0,762	2,457	3,966

Gruppe 3		Human-Ig [mg/ml]			
Maus-Nr.	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 42	Tag 56
16	0	0,506			5,137
17	0	0,419	1,077		4,924
18	0	0,546	0,984	2,027	5,988
19	0	0,737	1,661	2,642	9,732
20	0	0,306	0,973	2,857	6,03
21	0	0,288	0,899	4,516	
22	0	0,308	0,651	2,064	3,413
23	0	0,524	2,261	3,405	4,711

Gruppe 4		Human-Ig [mg/ml]			
Maus-Nr.	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 42	Tag 56
24	0	0,516	1,611	2,13	7,59
25	0	0,498	1,856	4,37	5,86
26	0	0,759	3,633	4,4	7,98
27	0	0,419	1,211	4,92	4,69
28	0	0,588	4,167	5,26	11,4
29	0	0,263	0,561	0,52	1,29
30	0	0,519	1,433	0,99	
31	0	0,055	0,045		

Gruppe 5	Human-Ig [mg/ml]				
Maus-Nr.	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 42	Tag 56
32	0	0,043	0,021	0,18	
33	0	0,421			5,13
34	0	0,619	2,589	2,01	2,67
35	0	0,101	0,943	1,49	2,59
36	0	0,686	2,856	2,37	4,98
37	0	0,224	0,678	0,77	6,85
38	0	0,136	0,548	0,57	9,49
39	0	0,752	1,767	1,98	2,33

Gruppe 6	Human-Ig [mg/ml]				
Maus-Nr.	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 42	Tag 56
40	0	0,638	2,767	6,49	13,06
41	0	0,319	0,912	0,94	
42	0	0,812	2,611	3,41	8,71
43	0	0,033			
44	0	0,654	2,3	5,57	6,22
45	0	0,605	1,322	7,12	7,86
46	0				
47	0	0,661	1,789	2,38	11,82

Gruppe 7	Human-Ig [mg/ml]				
Maus-Nr.	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 42	Tag 56
48	0			3,05	3,25
49	0	0,296	1,7		2,64
50	0	0,024			
51	0	0,028	0,137	0,06	
52	0	0,661	3,767		
53	0	0,04			
54	0	0,605	2,011	3,55	4,94
55	0	0,093	0,989	2,11	

Gruppe 8	Human-Ig [mg/ml]				
Maus-Nr.	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 42	Tag 56
56	0	0,535	1,389	3,81	4,14
57	0		2,011	3,67	3,27
58	0	0,635	3,1	3,09	3,41
59	0	0,036	0,01	0,39	
60	0	0,557	3,078	1,63	4,83
61	0	0,729			2,87
62	0	0,611	3,189	3,22	2,67
63	0	0,511	1,522	2,06	2,12

Gruppe 9	Human-Ig [mg/ml]					
Maus-Nr.	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 42	Tag 56	Tag 70
64	0			3,55		
65	0	6,78		1,17	6,86	
66	0	1,98		6,71	6,41	10,91
67	0	6,1		19,1		
68	0	8,32		7,48		
69	0			3,1	6,34	

Gruppe 10	Human-Ig [mg/ml]					
Maus-Nr.	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 42	Tag 56	Tag 70
70	0			4,17	2,69	5,64
71	0	8,98		14,8	13	
72	0	2,44		7,17	4,01	3,55
73	0	5,17		6,78	18,46	
74	0	6,48		4,32	5,09	13,87
75	0			1,01	14,73	

Gruppe 11	Human-Ig [mg/ml]					
Maus-Nr.	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 42	Tag 56	Tag 70
76	0			5,21	11,69	8,96
77	0	1,1		0,13		
78	0			8,17	7,82	
79	0	2,75				

Gruppe 12	Human-Ig [mg/ml]					
Maus-Nr.	Tag 0	Tag 14	Tag 28	Tag 42	Tag 56	Tag 70
80	0			0,55	0,14	
81	0		0,94			
82	0		0,17	0,86	0,18	
83	0			0,21	0,14	

Literaturverzeichnis:

Ahmed AR, Yunis EJ, Khatri K, Wagner R, Notani G, Awdeh Z, Alper CA. (1990). Major histocompatibility complex haplotype studies in Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7658-7662

Ahmed AR, Wagner R, Khatri K, Notani G, Awdeh Z, Alper CA, Yunis EJ. (1991). Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5056-5060

Ahmed AR, Mohimen A, Yunis EJ, Mirza NM, Kumar V, Beutner EH, Alper CA. (1993). Linkage of pemphigus vulgaris antibody to the major histocompatibility complex in healthy relatives of patients. *J Exp Med* 177: 419-424

Albert SE, McKerlie C, Pester A, Edgell BJ, Carlyle J, Petric M, Chamberlain JW. (1997). Time-dependent induction of protective anti-Influenza immune responses in human peripheral blood lymphocyte/ SCID mice. *J Immunol* 159: 1393-1403

Altmann DM. (1992). HLA-DQ associations with autoimmune disease. *Autoimmunity* 14:79-83

Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. (1991). Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 67: 869-877

Amagai M, Karpati S, Prussick R, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. (1992). Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J Clin Invest* 90: 919-926

Amagai M, Hashimoto T, Shimizu N, Nishikawa T. (1994). Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by baculovirus. *J Clin Invest* 94: 59-67

Amagai M. (1995). Adhesion molecules. I: Keratinocyte-keratinocyte interactions; cadherins and pemphigus. *J Invest Dermatol* 104: 146-152

Amagai M. (1996a). Pemphigus: autoimmunity to epidermal cell adhesion molecules. *Adv Dermatol* 11: 319-352

Amagai M, Koch PJ, Nishikawa T, Stanley JR. (1996b). Pemphigus vulgaris antigen (Desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. *J Invest Dermatol* 106: 351-355

Amagai M, Nishikawa T, Noursari HC, Anhalt GJ, Hashimoto T. (1998). Antibodies against desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) are present in sera from patients with paraneoplastic pemphigus and cause acantholysis in vivo in neonatal mice. *J Clin Invest* 102: 775-782

Amagai M, Tsunoda K, Zillikens D, Nagai T, Nishikawa T. (1999). The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J Am Acad Dermatol* 40: 167-170

- Amagai M, Tsunoda K, Suzuki H, Koyasu S, Nishikawa T. (2000). Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. *J Clin Invest* 105: 625-631
- Arnemann J, Spurr NK, Buxton RS. (1992). The human gene (DSG3) coding for the pemphigus vulgaris antigen is, like the genes coding for the other two known desmogleins, assigned to chromosome 18. *Hum Genet* 89: 347-350
- Barry TS, Haynes BF. (1992). *In vivo* models of human lymphopoiesis and autoimmunity in severe combined immune deficient mice. *J Clin Immunol* 12: 311-324
- Beutner EH, Jordon RE. (1964). Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. *Proc Soc Exp Biol Med* 117: 505-510
- Bhol K, Mohimen A, Ahmed AR. (1994). Correlation of subclasses of IgG with disease activity in pemphigus vulgaris. *Dermatology* 189 (suppl 1): 85-89
- Bhol K, Natarajan K, Nagarwalla N, Mohimen A, Aoki V, Ahmed AR. (1995). Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenic and nonpathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris: A model for autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5239-5243
- Bhol K, Yunis J, Ahmed AR. (1996). Pemphigus vulgaris in distant relatives of two families: association with major histocompatibility complex class II genes. *Clin Exp Dermatol* 21: 100-103
- Bombil F, Kints JP, Scheiff JM, Bazin H, Latinne D. (1996). A promising model of primary human immunization in human -SCID mouse. *Immunobiol* 195: 360-375
- Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301: 527-530
- Bosma GC, Fried M, Custer RP, Carroll AM, Gibson DM, Bosma MJ. (1988). Evidence of functional lymphocytes in some (leaky) scid mice. *J Exp Med* 167: 1016-1033
- Bosma MJ, Carroll AM. (1991). The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol* 9: 323-350
- Bøyum A. (1968). Isolation of leukocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 21: 7-12
- Carroll AM, Bosma MJ. (1988). Detection and characterization of functional T cells in mice with severe combined immune deficiency. *Eur J Immunol* 18: 1965-1971
- Carroll AM, Hardy RR, Bosma MJ. (1989). Occurrence of mature B (IgM⁺, B220⁺) and T (CD3⁺) lymphocytes in SCID mice. *J Immunol* 143: 1087-1093
- Chargui J, Dye D, Blomberg J, Desgranges C, Touraine JL. (1995). The humanized severe combined immunodeficient mouse as a model for primary human humoral response against HIV1 peptides. *J Immunol Meth* 181: 91-100

Chow LH, Beisel KW, McManus BM. (1992). Enteroviral infection of mice with severe combined immunodeficiency: evidence for direct viral pathogenesis of myocardial injury. *Lab Invest* 66: 24-31

Christophers E, Sterry W, Schubert C, Bräuer H. (1987). *Elementa dermatologica. Medical Service, München.*

Czitrom AA, Edwards S, Phillips RA, Bosma MJ, Marrack P, Kappler JW. (1985). The function of antigen-presenting cells in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol* 134: 2276-2280

Delgado JC, Yunis DE, Bozon MV, Salazar M, Deulofeut R, Turbay D, Mehra NK, Pasricha JS, Raval RS, Patel H, Shah BK, Bhol K, Alper CA, Ahmed AR, Yunis EJ. (1996). MHC class II alleles and haplotypes in patients with pemphigus vulgaris from India. *Tissue Antigens* 48: 668-672

Delgado JC, Hameed A, Yunis JJ, Bhol K, Rojas AI, Rehman SB, Khan AA, Ahmad M, Alper CA, Ahmed AR, Yunis EJ. (1997). Pemphigus vulgaris autoantibody response is linked to HLA-DQB1*0503 in Pakistani patients. *Hum Immunol* 57: 110-119

Deschryver-Kecskemeti K, Bancroft GH, Bosma GC, Bosma MJ, Unanue ER. (1988). Pathology of *Listeria* infection in murine severe combined immunodeficiency. A study by immunochemistry and electron microscopy. *Lab Invest* 58: 698-705

Dickey WD, Harley JB, Scofield RH. (1994). Human autoantibody production in the severe combined immunodeficiency (*scid*) mouse. *Clin Exp Rheumatol* 12: 157-161

Ding X, Aoki V, Mascaro JM, Lopez-Swiderski A, Diaz LA, Fairley JA. (1997). Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. *J Invest Dermatol* 109: 592-596

Ding X, Diaz LA, Fairley JA, Giudice GJ, Liu Z. (1999). The anti-desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris sera are pathogenic. *J Invest Dermatol* 112: 739-743

Dorshkind K, Pollack SB, Bosma MJ, Phillips RA. (1985). Natural killer (NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (*SCID*). *J Immunol* 134: 3798-3801

Duchosal MA, McConahey PJ, Robinson CA, Dixon FJ. (1990). Transfer of human systemic lupus erythematosus in *SCID* mice. *J Exp Med* 172: 985

Duchosal MA. (1992). *SCID* mice in the study of human autoimmune diseases. *Springer Semin Immunopathol* 14: 159-177

Duchosal MA, Eming SA, Fischer P, Leturcq D, Barbas CF III, McConahey PJ, Caothien RH, Thornton GB, Dixon FJ, Burton DR. (1992). Immunization of hu-PBL-*SCID* mice and the rescue of human monoclonal Fab fragments through combinatorial libraries. *Nature* 355: 258-262

Elkon KB, Ashany D. (1993). The *SCID* mouse as a vehicle to study autoimmunity. *Br J Rheumatol* 32: 4-12

- Emery DJ, Diaz LA, Fairley JA, Lopez A, Taylor AF, Giudice GJ. (1995). Pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris autoantibodies react with the extracellular domain of desmoglein 1 (Dsg 1). *J Invest Dermatol* 104: 323-328
- Fan JL, Memar O, McCormick DJ, Prabhakar BS. (1999). BALB/c mice produce blister-causing antibodies upon immunization with a recombinant human desmoglein 3. *J Immunol* 163: 6228-6235
- Fulop GM, Phillips RA. (1986). Full reconstitution of the immune deficiency in scid mice with normal stem cells requires low dose irradiation of the recipients. *J Immunol* 136: 4438-4443
- Fulop GM, Phillips RA. (1990). The *SCID* mutation in mice causes a general defect in DNA repair. *Nature* 347: 479-482
- Gasparro FP. (2000). Photodermatology: progress, problems and prospects. *Eur J Dermatol* 10: 250-254
- George A, Kost SI, Witzleben CL, Cebra JJ, Rubin DH. (1990). Reovirus-induced liver disease in severe combined immunodeficient (*SCID*) mice. A model for the study of viral infection, pathogenesis, and clearance. *J Exp Med* 171: 929-934
- Hammarström L, Abedi MR, Hassan MS, Smith CIE. (1993). The *SCID* mouse as a model for autoimmunity. *J Autoimmun* 6: 667-674
- Hashimoto T, Amagai M, Garrod DR, Nishikawa T. (1995). Immunofluorescence and immunoblot studies on the reactivity of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera with desmoglein 3 and desmoglein 1. *Epithelial Cell Biol* 4: 63-69
- Hertl M, Sundaram H, Amagai M, Stanley JR, Katz SI. (1995). Characterization of T cell epitopes of the pemphigus vulgaris antigen. *J Invest Dermatol* 104: 569A
- Hertl M. (1996). In-vitro-Untersuchungen zur Rolle von T-Lymphozyten bei der Pathogenese entzündlicher bullöser Dermatosen. *Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät der RWTH Aachen*. Aachen
- Hertl M, Amagai M, Sundaram H, Stanley J, Katz SI. (1998a). Recognition of desmoglein 3 by autoreactive T cells in pemphigus vulgaris patients and normals. *J Invest Dermatol* 110: 62-66
- Hertl M, Karr RW, Amagai M, Katz SI. (1998b). Heterogeneous MHC II restriction pattern of autoreactive desmoglein 3 specific T cell responses in pemphigus vulgaris patients and normals. *J Invest Dermatol* 110: 388-392
- Ishikawa H, Li K, Tamai K, Sawamura D, Uitto J. (2000). Cloning of the mouse desmoglein 3 gene (Dsg3): interspecies conservation within the cadherin superfamily. *Exp Dermatol* 9: 229-239
- Janeway CA Jr, Travers P. (2001). Immunobiology: The immune system in health and disease (5th ed.). *Garland/ Current Science*, London.

Joske DJ, Ma DT, Langlands DR, Owen ET. (1997). Autologous bone-marrow transplantation for rheumatoid arthritis. *Lancet* 350: 337-338

Juhász I, Lazarus GS, Murphy GF, Shih IM, Herlyn M. (1993). Development of pemphigus vulgaris-like lesions in severe combined immunodeficiency disease mice reconstituted with lymphocytes from patients. *J Clin Invest* 92:2401-2407

Karpati S, Amagai M, Prussick R, Cehrs K, Stanley JR. (1993). Pemphigus vulgaris antigen, a desmoglein type of cadherin, is located within keratinocyte desmosomes. *J Cell Biol* 122: 409-415

Kirchgessner CU, Patil CK, Evans JW, Cuomo CA, Fried LM, Carter T, Oettinger MJ, Brown JM. (1995). DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. *Science* 267:1178-1183

Koch PJ, Walsh MJ, Schmelz M, Goldschmidt MD, Zimbelmann R, Franke WW. (1990). Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. *Eur J Cell Biol* 53: 1-12

Koch PJ, Mahoney MG, Ishikawa H, Pulkkinen L, Uitto J, Shultz L, Murphy GF, Whitake-Menezes D, Stanley JR. (1997). Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol* 137: 1091-1102

Krams SM, Dorshkind K, Gershwin ME. (1989). Generation of biliary lesions after transfer of human lymphocytes into severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J Exp Med* 170: 1919-1930

Lin MS, Swartz SJ, Lopez A, Ding X, Fairley JA, Diaz LA. (1997). T lymphocytes from a subset of patients with pemphigus vulgaris respond to both desmoglein-3 and desmoglein-1. *J Invest Dermatol* 109: 734-737

Lin MS, Swartz SJ, Lopez A, Ding X, Fernandez-Vina MA, Stastny P, Fairley JA, Diaz LA. (1997). Development and characterization of desmoglein-3 specific T cells from patients with pemphigus vulgaris. *J Clin Invest* 99: 31-40

Lucas AH, Siff TE, Trujillo KH, Kitamura MY. (1992). Vaccine-induced human antibody responses to the *Haemophilus influenzae* b polysaccharide in severe combined immunodeficient mice engrafted with human leukocytes. *Pediatr Res* 32: 132-135

Macht L, Fukuma N, Leader K, Sarsero D, Pegg CAS, Phillips DIW, Yates P, McLachlan SM, Elson C, Rees Smith B. (1991). Severe combined immunodeficient (SCID) mice: a model for investigating human thyroid autoantibody synthesis. *Clin Exp Immunol* 84: 34-42

Macht LM, Corral RJ, Banga JP, Elson CJ. (1993). Control of human thyroid autoantibody production in SCID mice. *Clin Exp Immunol* 91: 390-396

Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR. (1999). Explanation for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest* 103:461-468

- Mascaro JM, Espana A, Liu Z, Ding X, Swartz SJ, Fairley JA, Diaz LA. (1997). Mechanisms of acantholysis in pemphigus vulgaris: role of IgG valence. *Clin Immunol Immunopathol* 85: 90-96
- Memar OM, Rajaraman S, Thotakura R, Tying SK, Fan JL, Seetharamaiah GS, Lopez A, Jordon RE, Prabhakar BS. (1996). Recombinant desmoglein 3 has the necessary epitopes to adsorb and induce blister-causing antibodies. *J Invest Dermatol* 106: 261-268
- Merlob P, Metzker A, Hazaz BA, Rogovin H, Reisner SH. (1986). Neonatal pemphigus vulgaris. *Pediatrics* 78: 1102-1105
- Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB. (1988). Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 335: 256-259
- Mosier DE. (1991). Adoptive transfer of human lymphoid cells to severely immunodeficient mice: models for normal human immune function, autoimmunity, lymphomagenesis, and AIDS. *Adv Immunol* 50: 303-325
- Musseteau C, Schaible UE, Stehle T, Kramer MD, Simon MM. (1991). Myositis in mice inoculated with *Borrelia burgdorferi*. *Am J Pathol* 139: 1267-1271
- Narayanan R, Joyce WA, Greenfield RA. (1991). Gastrointestinal candidiasis in a murine model of severe combined immunodeficiency syndrome. *Infect Immun* 59: 2116-2119
- Nash RA. (2000). Prospects of stem cell transplantation in autoimmune diseases. *J Clin Immunol* 20: 38-45
- Nelson FK, Greiner DL, Shultz LD, Rajan TV. (1991). The immunodeficient *SCID* mouse as a model for human lymphatic filariasis. *J Exp Med* 173: 659-663
- Niizeki H, Inoko H, Narimatsu H, Takata H, Sonoda A, Tadakuma T, Ando A, Tsuji K, Hashimoto T, Nishikawa T. (1991). HLA class II antigens are associated with Japanese pemphigus patients. *Hum Immunol* 31: 246-250
- Niizeki H, Inoko H, Mizuki N, Inamoto N, Watababe K, Hashimoto T, Nishikawa T. (1994). HLA-DQA1, -DQB1 and -DRB1 genotyping in Japanese *pemphigus vulgaris* patients by the PCR-RFLP method. *Tissue Antigens* 44: 248-251
- Nonoyama S, Smith FO, Ochs HD. (1993). Specific antibody production to a recall or a neoantigen by *SCID* mice reconstituted with human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 151: 3894-3901
- Oliven A, Shecher Y. (2001). Extracorporeal photopheresis: a review. *Blood Rev* 15: 103-108
- Pestel J, Jeannin P, Delneste Y, Dessaint JP, Cesbron JY, Capron A, Tsicopoulos A, Tonnel AB. (1994). Human IgE in *SCID* mice reconstituted with peripheral blood mononuclear cells from *Dermatophagoides pteronyssinus*-sensitive patients. *J Immunol* 153: 3804-3810
- Rädisch T, Riechers R, Hertl M. (2002). The humanized *SCID* mouse model to study HLA class II-linked autoimmunity to desmoglein 3 in pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 146: 189-193

Revenge-Arranz F, Martinez-Lasso J, Vanaclocha-Sebastian F. (1996). Pemphigus vulgaris in two MHC-haploidentical brothers. *Dermatology* 193: 71-72

Riechers R, Grotzinger J, Hertl M. (1999). HLA class II restrictions of autoreactive T cell responses in pemphigus vulgaris: review of the literature and potential applications for the development of a specific immunotherapy. *Autoimmunity* 30(3): 183-196

Roscoe JT, Diaz L, Sampaio SA, Castro RM, Labib RS, Takahashi Y, Patel H, Anhalt GJ. (1985). Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer. *J Invest Dermatol* 85: 538-541

Schiltz JR, Michel B. (1976). Production of epidermal acantholysis in normal human skin in vitro by the IgG fraction from pemphigus serum. *J Invest Dermatol* 67: 254-260

Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP et al. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68: 855-867

Somasundaram R, Jacob L, Adachi K, Class R, Scheck S, Maruyama H, Herlyn D. (1995). Limitations of the severe combined immunodeficiency (SCID) mouse model for the study of human B-cell responses. *Scand J Immunol* 41: 384-390

Spaethe R, du Moulin A, Bieber F, Bohm W. (1993). Principles of immunapheresis and specific elimination of plasma components. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol* 21: 239-251

Stanley JR. (1989). Pemphigus and pemphigoid as paradigms of organ-specific, autoantibody-mediated diseases. *J Clin Invest* 83: 1443-1448

Stanley JR. (1993). Cell adhesion molecules as targets of autoantibodies in pemphigus and pemphigoid, bullous diseases due to defective epidermal cell adhesion. *Adv Immunol* 53: 291-325

Stanley JR. (1995). Defective cell-cell adhesion in the epidermis. *Ciba Found Symp* 189: 107-120

Tighe H, Silverman GH, Kozin F, Tucker R, Gulizia R, Peebles C, Lotz M, Rhodes G, Machold K, Mosier DE, Carson DA. (1990). Autoantibody production by severe combined immunodeficient mice reconstituted with synovial cells from rheumatoid arthritis patients. *Eur J Immunol* 20: 1843-1848

Trueb M. (1995). Autoaggressionskrankheit-assozierte MHC-Klasse-II-Moleküle. *Hautarzt* 46: 225-227

Tyndall A, Fassas A, Passweg J, Ruiz de Elvira C, Attal M, Brooks P, Durez P et al. (1999). Autologous haematopoietic stem cell transplants for autoimmune disease—feasibility and transplant-related mortality. *Bone Marrow Transplant* 24: 729-734

Vladutiu AO. (1993). The severe combined immunodeficient (SCID) mouse as a model for the study of autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* 93: 1-8

- Vladutiu AO. (1994). Can autoimmune diseases be induced in severe combined immunodeficient (SCID) mice? *Res Immunol* 145: 363-370
- Voet D, Voet GJ, Pratt CW. (1999). Fundamentals of biochemistry. *John Wiley & Sons*, New York.
- Walker W, Gallagher G. (1994). The *in vivo* production of specific human autoantibodies by vaccination of human-PBL-SCID mice. *Immunology* 83: 163-170
- Wang ZY, Karachunski PI, Howard JF Jr, Conti-Fine BM. (1999). Myasthenia in SCID mice grafted with myasthenic patient lymphocytes: role of CD4⁺ and CD8⁺ cells. *Neurology* 52: 484-497
- Wucherpfennig KW, Strominger JL. (1995a). Selective binding of self peptides to disease-associated major histocompatibility complex (MHC) molecules: A mechanism for MHC-linked susceptibility to human autoimmune diseases. *J Exp Med* 181: 1597-1601
- Wucherpfennig KW, Yu B, Bhol K, Monos DS, Argyris E, Karr RW, Ahmed AR, Strominger JL. (1995b). Structural basis for major histocompatibility complex (MHC)-linked susceptibility to autoimmunity: Charged residues of a single MHC binding pocket confer selective presentation of self-peptides in pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11935-11939
- Yamashina Y, Miyagawa S, Kawatsu T, Lida T, Higashimine I, Shirai T, Kaneshige T. (1998). Polymorphisms of HLA class II genes in Japanese patients with pemphigus vulgaris. *Tissue Antigens* 52: 74-77
- Zillikens D, Schmidt E, Reimer S, Chimanovitch I, Hardt-Weinelt K, Rose C, Brocker EB, Kock M, Boehncke WH. (2001). Antibodies to desmogleins 1 and 3, but not to BP180, induce blisters in human skin grafted onto SCID mice. *J Pathol* 193: 117-124

Danksagung

Folgenden Personen, die mich bei der Planung, Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle danken:

- Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Michael Hertl für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete und kontinuierliche Betreuung.
- Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Hans F. Merk für die Übernahme des Korreferats.
- Frau Diplom-Biologin Regine Riechers, Frau Dr. rer. nat. Lioba Büdinger und allen anderen Mitarbeitern des Immunologischen Labors der Hautklinik für die sehr gute und angenehme Zusammenarbeit.
- Herrn Dr. Kluge und Frau Dr. Herweg vom Institut für Versuchstierkunde für die Einweisung und hervorragende Unterstützung bei der Arbeit mit den *SCID*-Mäusen.
- Meiner Familie für dauerhafte Unterstützung und Rückhalt.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Thomas Rädisch
geb.: 03.12.1974 in Aachen
Bekenntnis: römisch-katholisch
Eltern: Dr. rer. nat. Helmer Rädisch, Dipl.-Chemiker und
Josiane Rädisch-Charbonnier, Dozentin für Wirtschaftsfranzösisch

Schulabschluss und Studium

Mai 1994 Abitur am Bischöflichen Pius-Gymnasium in Aachen
Juli - August 1994: Krankenpflegepraktikum an der Kinderklinik der RWTH Aachen
Oktober 1994 Beginn des Medizinstudiums an der RWTH Aachen
September 1996 Ärztliche Vorprüfung
August 1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 1997 United States Medical Licensing Examination Step 1
Juli - August 1998 Famulatur am Department of Dermatology, College of Physicians and Surgeons of Columbia University, New York
August - Sept. 1998 Famulatur am Department of Pediatrics, Saint Vincents Hospital of New York Medical College, New York
Okt. 1998 - Jan. 1999 Erasmus-Stipendium an der Universität Maastricht zur Teilnahme an zwei klinischen Kursen nach dem Prinzip des "Problem Based Learning" (ALMA-Programm)
März 2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2000 United States Medical Licensing Examination Step 2
April - August 2000 PJ-Tertial an der Neurologischen Klinik der RWTH Aachen
August - Nov. 2000 PJ-Tertial in der Inneren Medizin am Centre Hospitalier Peltzer-La Tourelle in Verviers, Belgien (Lehrkrankenhaus der Universität Lüttich)
Dez.2000-März 2001 PJ-Tertial an der Chirurgischen Universitätsklinik Maastricht, Niederlande (Erasmus-Programm)
Juni 2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit Dezember 2001 Arzt im Praktikum und Assistenzarzt an der Neurologischen Klinik (Chefarzt Prof. Dr. med. J. Haan), Kliniken Maria Hilf Mönchengladbach, Akademisches Lehrkrankenhaus der RWTH Aachen

Dissertation

- Ab November 1997 Experimentelle Arbeit im Immunologischen Labor der Hautklinik der RWTH Aachen (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. F. Merk) unter Betreuung von Univ.-Prof. Dr. med. M. Hertl, jetzt Universität Erlangen-Nürnberg
- Februar 2000 Posterpräsentation auf der 27. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung in Wien
„The humanized *SCID* mouse model to study HLA class II-linked autoimmunity to desmoglein 3 in pemphigus vulgaris”
Abstractveröffentlichung in *Arch Dermatol Res* (2000) 292, 2/3: 145
- November 2001 Vortrag auf der 12th European Students Conference in Berlin
„The humanized *SCID* mouse model – a possible *in vivo* model for pemphigus vulgaris?”
Verleihung des Zondek Award For Best Oral Presentation
- Juni - Nov. 2001 Niederschrift der Dissertation
- Januar 2002 Rädisch T, Riechers R, Hertl M. (2002). „The humanized *SCID* mouse model to study HLA class II-linked autoimmunity to desmoglein3 in pemphigus vulgaris“ *Br J Dermatol* 146:189-193