

Aus dem Institut für Anatomie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

Analyse des follikulären T-Helferzellrezeptorropertoires
aus Keimzentren im Mausmodell der experimentellen
Epidermolysis bullosa acquisita

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

-Aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von
Julia Katharina Belde
aus Hamburg

Lübeck 2022

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Kathrin Kalies
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Enno Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2022

Zum Druck genehmigt Lübeck, den 19.05.2022

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	6
1.1 AUTOIMMUNERKRANKUNGEN.....	6
1.1.1 Autoantikörperbildung beginnt im Keimzentrum: Die Keimzentrumsreaktionen.....	7
1.2 PATHOGENESE DER AUTOIMMUNITÄT	9
1.2.1 Primärentwicklung der T-Lymphozyten im Thymus	9
1.2.2 Der MHC-Komplex und die positive Selektion.....	12
1.2.3 Negative Selektion und zentrale Toleranz	12
1.2.4 Aktivierung der naiven T-Zellen und Prinzip der peripheren Toleranz	12
1.2.5 Die Tfh-Zelle als zentraler Ausgangspunkt der Autoimmunität	15
1.3 DAS T-ZELL-REZEPTOR-REPertoire UND DIE REPertoire-ANALYSE	16
1.4 EPIDERMOLYSIS BULLOSA ACQUISITA (EBA) EINE DURCH AUTOANTIKÖRPER VERMITTELTE AUTOIMMUNERKRANKUNG	17
1.4.1 Repertoiranalyse von Tfh-Zellen bei an EBA erkrankten Mäusen	21
1.5 ZIEL UND FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT.....	21
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 MATERIALIEN	23
2.2 EXPERIMENT	23
2.2.1 Versuchstiere und Haltung.....	23
2.2.2 Validierung des rekombinanten Proteins.....	23
2.2.3 Immunisierung und Verlauf.....	25
2.2.4 Organentnahme.....	26
2.3 FÄRBUNG VON GEFRIERSCHNITTEN DER HAUT.....	26
2.3.1 Immunhistochemische Färbungen.....	26
2.3.2 Immunfluoreszenzfärbung	27
2.3.3 Mikroskopieren und Fotografieren der Färbungen.....	28
2.4 LASERMIKRODISSEKTION.....	28
2.4.1 Toluidinblaufärbung	29
2.4.2 Ki.67, B220 und bTCR β -Färbung.....	29
2.5 RNA-ISOLATION.....	30
2.6 CDNA-SYNTHESE	31
2.7 QUANTITATIVE ECHTZEIT PCR (QRT-PCR).....	31
2.8 SEQUENZIERUNG.....	33

2.8.1	Quantifizierung der RNA-Menge	33
2.8.2	Amplikon-rettende multiplex PCR.....	34
2.8.3	Agarosegel-Elektrophorese	35
2.8.4	DNA Gel-Eluation.....	35
2.8.5	Quantifizierung der cDNA-Menge	36
2.8.6	Herstellen einer Library	37
2.8.7	Durchführung der Sequenzierung.....	38
2.8.8	Aufbereitung der Sequenzierungsdaten	39
2.8.9	Auswertung der Sequenzierungsdaten.....	40
2.8.10	Berechnung der Indices.....	40
2.8.11	Statistische Auswertung.....	41
3	ERGEBNISSE.....	42
3.1	ETABLIERUNG DER METHODE: MÄUSE IN VERSUCHSGRUPPE ERKRANKEN AN EBA 42	
3.1.1	Kratzerosion fördert Entzündungsreaktion	43
3.1.2	Autoantikörperbildung und Aktivierung des Komplementsystems in der Versuchsgruppe: Die Mäuse sind an EBA erkrankt	45
3.2	BILDUNG VON KEIMZENTREN	46
3.2.1	Tfh spezifisches Zytokin vermehrt bei Autoimmunität exprimiert.....	46
3.2.2	Keimzentren sind in den Lymphknoten beider Gruppen auszumachen	48
3.3	ANALYSE DES TFH-LYMPHOZYTENREZEPTOR- β -REPERTOIRE BEI EBA.....	50
3.3.1	Kein Unterschied in der Anzahl der Klonotypen beider Gruppen	50
3.3.2	Häufigkeitsverteilung zeigt ungleiche Verteilung in allen Mäusen sowohl in Versuchs- als auch Kontrollgruppe.....	51
3.3.3	Akkumulation von Tfh-Klonotypen, die das V2-Segment benutzen unter Autoimmunität	53
3.3.4	Diversität nimmt unter Autoimmunität ab.....	56
3.3.5	Öffentliche Klonotypen benutzen vermehrt das V2-Gen-Segment bei EBA 57	
3.3.6	Im Seitenvergleich akkumulieren die gleichen Klonotypen bei Autoimmunität.....	59
3.4	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	62
4	DISKUSSION.....	63
4.1	VERÄNDERUNGEN IM TFH-LYMPHOZYTENREZEPTOR- β -REPERTOIRE BEI IMMUNISIERUNG MIT VWFA2	63
4.1.1	Voraussetzungen für die Analyse des Tfh-Lymphozytenrezeptor- β - Repertoires.....	64

4.1.2	Bildung von Keimzentren in der Kontroll- sowie in der Versuchsgruppe ..	65
4.1.3	Gleiche Anzahl von Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen in den Keimzentren der drainierenden Lymphknoten gefunden.....	67
4.1.4	Ungleiche Häufigkeitsverteilung in allen Mäusen sowohl in Versuchs- als auch in Kontrollgruppe.....	67
4.1.5	Akkumulation von autoreaktiven spezifischen Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen	69
4.2	DIE DIVERSITÄT DES TFH-LYMPHOZYTENREZEPTOR- β -REPERTOIRES NIMMT BEI AUTOIMMUNITÄT AB.....	71
4.3	UNIFORMITÄT DES TFH-LYMPHOZYTENREZEPTOR- β -REPERTOIRES IN KONTRALATERALEN LYMPHKNOTEN BEI EBA	73
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	76
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	78
7	ANHANG	87
7.1	VERWENDETE CHEMIKALIEN UND KITS	87
7.2	VERWENDETE LÖSUNGEN UND PUFFER	89
7.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN	90
7.4	VERWENDETE GERÄTE UND INSTRUMENTE	91
7.5	VERWENDETE SOFTWARE.....	93
7.6	ANTIKÖRPER.....	94
7.7	VERWENDETE PRIMER.....	95
7.8	ZUSAMMENFASSUNG DER T-LYMPHOZYTEN-REZEPTOR-B-KLONOTYPEN.....	97
7.9	LISTE DER CRD3-AMINOSÄURESEQUENZEN DER TFH-LYMPHOZYTEN-REZEPTOR-B-KLONOTYPEN, DIE VON 3 MÄUSEN GETEILT WERDEN UND DAS V2-SEGMENT ENTHALTEN.	98
7.10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	99
7.11	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	102
7.12	TABELLENVERZEICHNIS.....	103
7.13	DANKSAGUNG.....	104
7.14	LEBENS LAUF.....	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Autoimmunerkrankungen

Autoimmunkrankheiten sind Erkrankungen, deren Prävalenz vor allem in den Industrieländern stetig zunimmt, auch wenn sie einzeln betrachtet relativ selten sind. Fasst man aber alle Autoimmunkrankheiten kumulativ zusammen, leiden 5-10% der industriellen Weltbevölkerung an Autoimmunkrankheiten.¹

Außerdem haben Autoimmunkrankheiten einen signifikanten Effekt auf Lebensqualität, Morbidität und Mortalität, sodass stetig nach neueren und verträglicheren Therapieformen gesucht wird. So ist es in den letzten Jahren schon zu deutlichen Fortschritten in der Diagnostik und Therapie von Autoimmunkrankheiten gekommen. Die Ätiologie ist trotzdem noch nicht vollständig entschlüsselt.² Somit ist es bisher noch nicht gelungen, eine Heilung von Autoimmunkrankheiten zu erzielen. Die bisherigen Therapieansätze sind dabei zumeist eher immunsuppressive Ansätze, die mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen einhergehen. Um diese Therapieansätze individueller und nebenwirkungsärmer zu gestalten, wäre ein individuelles Immunmonitoring ein sinnvolles Tool.³ Dafür wäre es auch hilfreich, die genaue Pathogenese zu kennen und die autoreaktiven Zellen ausmachen zu können. Bei einer Autoimmunerkrankung greift das Immunsystem körpereigene Strukturen an. Dieses kann als systemische Erkrankung, wie zum Beispiel bei dem systemischen Lupus erythematodes (SLE) und der rheumatoiden Arthritis (RA), jegliche Strukturen betreffen oder organspezifisch auftreten, wie bei den bullösen Autoimmundermatosen.⁴

Es bilden sich gegen sich selbst gerichtete Autoantikörper und autoreaktive T-Zellen, die dann körpereigene Strukturen erkennen und binden und darüber pathologische Reaktionen auslösen können.⁵ Diese Autoantikörper werden von autoreaktiven Plasmazellen gebildet, die sich aus B-Lymphozyten differenzieren. Sie reifen in den Keimzentren der Lymphknoten mit Hilfe von autoreaktiven T-Zellen heran. Obwohl die Bildung der Autoantikörper von den B-Lymphozyten ausgeht, benötigt es für die Bildung und Aufrechterhaltung der Keimzentren Hilfe von spezialisierten Effektor CD4-T-Zellen, den folliculären T-Helferzellen (T_{fh}-Zelle).⁶

1.1.1 Autoantikörperbildung beginnt im Keimzentrum: Die

Keimzentrumsreaktionen

Damit es zur Autoantikörperbildung kommen kann, müssen sich in den sekundär lymphatischen Organen, wie zum Beispiel den Lymphknoten, Keimzentren bilden. Schematisch betrachtet ist ein Lymphknoten so aufgebaut, dass sich außen, also im Kortex, die B-Zell-Zone mit den inaktiven Primär-Follikeln oder aktiven Sekundär-Follikeln befindet. Daran anschließend findet sich der Parakortex, in dem sich die T-Zell-Zone befindet und im Inneren befindet sich das Mark. Diese Zonen sind allerdings nicht scharf begrenzt.⁷

Ein Keimzentrum entsteht dann, wenn eine B-Zelle außerhalb der Follikel in den T-Zell-reichen Zonen in Verbindung mit interdigitierenden Zellen oder T-Zellen von einem Antigen aktiviert wird.⁸ Diese aktivierten B-Zellen können dann entweder in extrafollikuläre Bereiche wandern und dort proliferieren und zu kurzlebigen Plasmazellen differenzieren, die kurzzeitig Antikörper produzieren können, oder sie werden zu Keimzentrums-B-Zellen (engl. *Germinal center* kurz im folgenden GC-B-Zellen), die in den Follikel wandern und dort ein Keimzentrum, in dem sie proliferieren und heranreifen, bilden. Dabei scheinen als ein wichtiger Mechanismus für die Differenzierung in diese GC-B-Zelle die kostimulatorischen Signale von Tfh-Zellen zu sein.⁹

Das entstehende Keimzentrum teilt sich in eine helle und eine dunkle Zone (Abb.1.1 A). Die Tfh-Zellen bleiben überwiegend in der hellen Zone, während die B-Zellen zwischen beiden Zonen zirkulieren. Erhält eine B-Zelle genug Hilfe in Form von Überlebenssignalen von einer Tfh-Zelle, wandert sie in die dunkle Zone, um dort zu proliferieren, und es kommt zur somatischen Hypermutation. Die Nachkommen dieser B-Lymphozyten haben nun durch die Mutationen ein ganzes Spektrum an Affinitäten für das Antigen. Sie wandern wieder in die helle Zone und konkurrieren dort um die Tfh-Zellen und das Antigen. B-Zellen, die nur wenig Antigen präsentieren oder dieses nicht stark genug binden, gehen auf diesem Wege in Apoptose. Es bleiben nur diejenigen B-Lymphozyten erhalten, die eine hohe Affinität für das Antigen haben, und diese proliferieren und mutieren erneut. So findet also im Keimzentrum durch die Tfh-Zellen eine positive Selektion statt, und die daraus selektierten B-Zellen sind langlebende Plasmazellen, die Antikörper produzieren, die eine hohe Affinität zu ihrem Antigen besitzen (Abb.1.1 B).^{6,10}

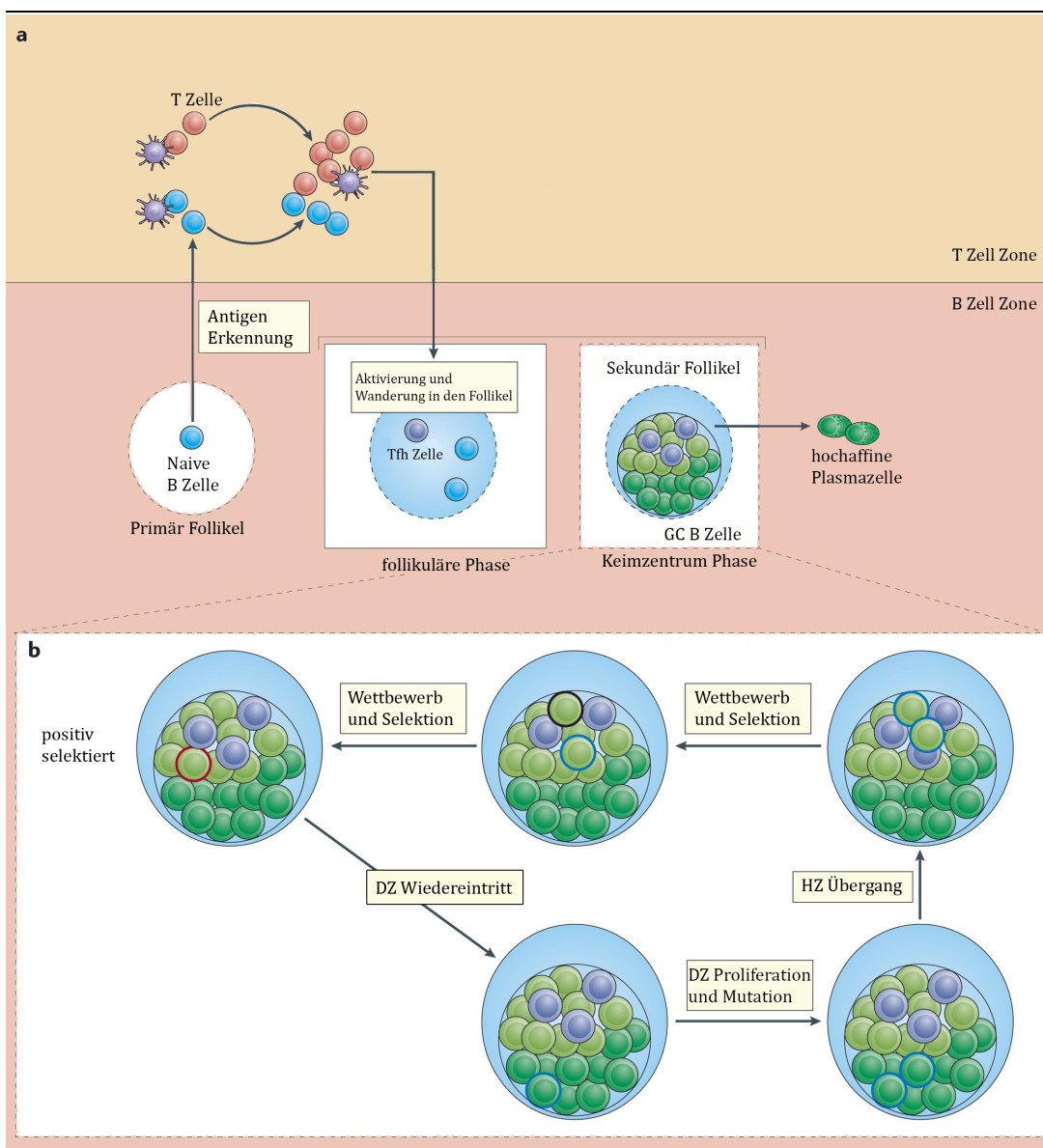


Abb.1.1 Keimzentrumsreaktionen: Tfh Zellen helfen bei der Entstehung von hochaffinen antikörperbildenden Plasmazellen

Abgebildet ist ein schematischer Ausschnitt aus einem Lymphknoten. A) Kommt es in der T-Zell-Zone zur Aktivierung durch ein Antigen von antigenspezifischen T- und B-Zellen, wandern diese zurück in den Follikel, und es entsteht ein Keimzentrum. Das entstehende Keimzentrum teilt sich in eine helle Zone (HZ, hellgrün) und eine dunkle Zone (DZ, dunkelgrün). B) Die Tfh-Zellen bleiben in der HZ, während die B-Zellen zyklisch zwischen beiden Zonen wandert. Eine B-Zelle, die genug Hilfe von einer Tfh-Zelle bekommen hat (roter Kreis), wandert in die DZ um dort zu proliferieren, und es kommt zur somatischen Hypermutation (blauer Kreis). Die entstandenen Nachkommen treten daraufhin wieder in die HZ ein, und es kommt zum Wettbewerb um Antigen und Hilfe von Tfh-Zellen. B-Zellen, die nicht genügend Hilfe bekommen, gehen in Apoptose (schwarzer Kreis). Nur die Zellen, die eine hohe Affinität fürs Antigen besitzen, werden von den Tfh-Zellen positiv selektiert und können das Keimzentrum nach mehreren dieser Runden schließlich als hochaffine Plasmazelle verlassen.

Darstellung adaptiert und übersetzt nach Qi (2016).⁶

Zusätzlich konnte bereits gezeigt werden, dass in Abwesenheit von antigenspezifischen Tfh-Zellen die GC-B-Lymphozyten eliminiert werden und sich die neu gebildeten Keimzentren nach ein paar Tagen wieder zurückgebildet haben.¹¹ Damit wird deutlich, wieso die Tfh-Zellen eine große und frühe Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen spielen, da sie die Bildung von hochaffinen Autoantikörpern fördern. Die Frage, die sich nun aufwirft, ist, wie es überhaupt dazu kommen kann, dass sich autoreaktive T- und B-Zellen bilden können.

1.2 Pathogenese der Autoimmunität

Einer der ersten Schritte in der Pathogenese hin zur Autoimmunität ist die Entstehung von autoreaktiven T- und B-Lymphozyten.¹² Autoreaktive T-Lymphozyten spielen bei Autoimmunkrankheiten auf Grund der in Kapitel 1.1.1 genannten B-Zell-Hilfe eine große Rolle.¹³ Es wird davon ausgegangen, dass mehrere Kontrollmechanismen des Körpers umgangen werden müssen, damit autoreaktive Lymphozyten entstehen.¹⁴ Dabei wird zwischen zentralen Toleranzmechanismen durch Selektion im Thymus und peripheren Toleranzmechanismen in den sekundär lymphatischen Organen unterschieden. Die ersten und wichtigsten Mechanismen hin zur Vermeidung von Autoimmunität sind dabei die zentralen Toleranzmechanismen.¹⁵

1.2.1 Primärentwicklung der T-Lymphozyten im Thymus

Lymphatische Vorläuferzellen verlassen das Knochenmark und wandern in den Thymus. Dort durchlaufen die T-Lymphozyten verschiedene Stadien bis zum reifen und differenzierten T-Lymphozyten mit T-Zellrezeptorkomplex. Die unreifen Vorläuferzellen tragen noch kaum Oberflächenmoleküle, die für reife T-Lymphozyten charakteristisch sind,¹⁶ und der Rezeptor ist noch nicht fertig ausgebildet. Durch Wechselwirkungen mit dem Thymusstroma wird die Differenzierung angestoßen.¹⁷ Zunächst bilden sich nur Marker, welche die T-Zell-Linie kennzeichnen, aber keines der Zelloberflächenmoleküle, die für reife T-Zellen typisch sind, also weder den CD3:T-Zell-Rezeptor-Komplex noch die Korezeptoren CD4 und CD8. Man nennt sie daher auch tripple negative T-Zellen.¹⁸ Diese tripple negativen Vorläuferzellen, können sich zu zwei Zell-Linien entwickeln. Entweder die $\gamma\delta$ -Zellen, die aber einen

sehr geringen Anteil ausmachen und daher im Weiteren nicht näher betrachtet werden. Oder die $\alpha\beta$ -Zell-Linie, die den Großteil der Population ausmacht.¹⁹ In ihrer Entwicklung exprimieren sie verschiedene Oberflächenmoleküle, und die Umlagerung und Formung des T-Zell-Rezeptors (TZR) beginnt. Dieses ist ein Heterodimer und besteht aus einer α - und β -Kette. Zunächst beginnt die Umlagerung der β -Ketten-Gene¹⁹, welche aus verschiedenen Gensegmenten bestehen. Im Falle der Maus sind dies 35 variable- (V), 2 diverse- (D), 14 verbindende- (J) und 2 konstante- (C) Gen-Segmente, wobei nur 21-22 V-, 2 D-, 11 J- und 2C-Gen-Segmente funktional sind.²⁰ Dabei werden zufällig ein D-Gen-Segment mit einem J-Gen-Segment verknüpft und anschließend wird dieses DJ-Gen-Segment zufällig mit einem V-Gen-Segment verknüpft und durch Translation und Spleißen mit einem C-Gen-Segment verbunden.²¹ Durch die zufällige Verknüpfung der verschiedenen Gensegmente entsteht eine riesige Anzahl an verschiedenen möglichen VDJC-Segmenten, aus denen der TZR- β bestehen kann. Dieser Vorgang entspricht der somatischen Rekombination.²² Außerdem kommt es zwischen den VD- und DJ-Segmenten zu dem zufälligen Hinzufügen und Entfernen von Nukleotiden, wodurch die Diversität nochmals erhöht wird.²³ Diese Regionen, in denen die Diversität am größten ist, werden *complementarity determining regions* (CDR) genannt. Während der CDR1 und -2 für die Erkennung der Moleküle, die das Antigen präsentieren, zuständig sind, besitzt die CDR3-Region die höchste Variabilität und ist für die Antigenerkennung zuständig (Abb. 1.2).^{24,25}

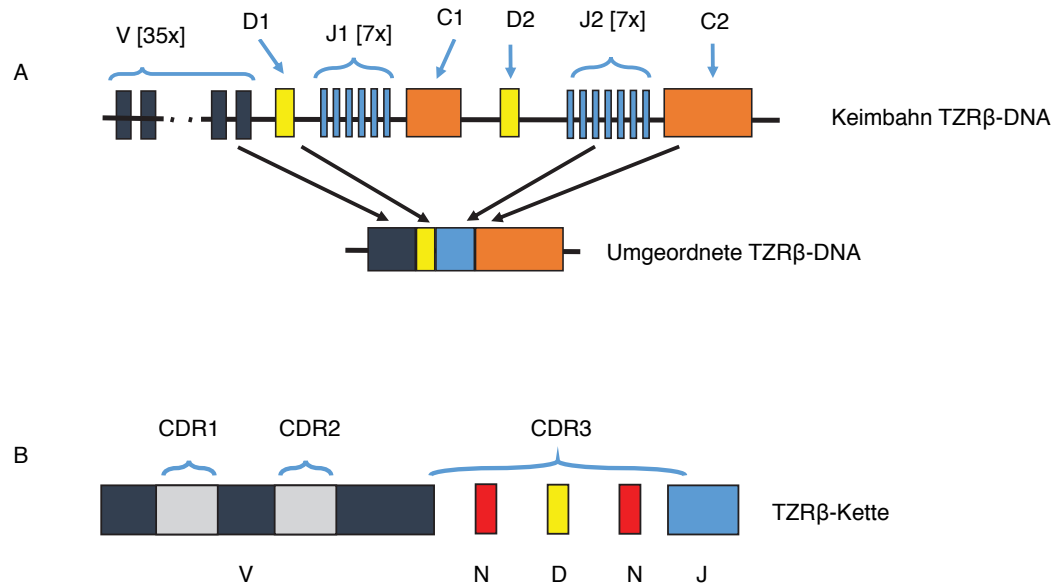


Abb.1.2 Somatische Rekombination der Gene für die β -Kette des murinen T-Zell-Rezeptors

A) Die Gene der β -Kette des T-Zell-Rezeptors (TZR) bestehen aus getrennten Segmenten, die während der Entwicklung der T-Zelle durch somatische Rekombination verknüpft werden. Dabei werden zufällig ein V-, ein D-, ein J- mit einem C-Gen-Segment verbunden. B) Während die *complementarity determining regions* (CDR) 1 und 2 auf dem V-Gen-Segment kodiert werden, werden zusätzlich zwischen den VD- und DJ-Gen-Segmenten noch zufällige Nukleotide eingefügt. So entsteht größte Variabilität in der CDR3-Region. Darstellung übersetzt nach Laydon et al. (2015).²⁵

Durch die Umlagerung der β -Kette kommt es schließlich zur Expressierung der Corezeptorproteine CD4 und CD8. Die T-Zellen werden nun doppelt positive T-Zellen genannt.²⁶ Diese Zellen proliferieren und fangen dann an, ihre α -Kette umzulagern. Dieses geschieht auch mit Hilfe der somatischen Rekombination und identisch zur β -Kette, nur dass die D-Gen-Segmente fehlen.²⁷ Die Maus besitzt dabei 98 V-, 60 J- und 1C-Gen-Segment für die α -Kette. Von diesen werden allerdings nur 84 V-, 38 J- und 1 C-Gen-Segmente benutzt.²⁸

Der doppelt positive T-Lymphozyt kann nun einen $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor ausbilden, dieser T-Zell-Rezeptor wird noch auf seine Funktionsfähigkeit geprüft, welches in Form von einer positiven und negativen Selektion stattfindet.^{29,30}

1.2.2 Der MHC-Komplex und die positive Selektion

Damit eine T-Zelle das Antigen erkennen kann, muss es an einen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) gebunden werden. Es gibt zwei verschiedene MHC-Komplexe (MHCI und MHCII). Bei der positiven Selektion im Thymus werden Selbst-Peptide auf den beiden verschiedenen MHC-Komplexklassen durch Epithelzellen präsentiert.³¹ Nur wenn ein doppelt positiver T-Lymphozyt diesen Komplex mit der CDR I und CDR II-Region des TZR erkennen kann, reift er weiter aus.³² Dabei ist es entscheidend, ob er ein Klasse I- oder Klasse II-MHC-Komplex bindet. Denn bindet er ein MHC-Klasse-II-Molekül, reift der Lymphozyt zur CD4+-T-Zelle heran, also verliert das CD8 Oberflächenmolekül. Im Falle der Erkennung eines MHC-Klasse-I-Moleküls reift er zur CD8+-Zelle heran.³⁰

1.2.3 Negative Selektion und zentrale Toleranz

Zur Unterdrückung der Entstehung von Autoimmunität ist die negative Selektion im Thymus extrem wichtig. Die Stromazellen des Thymus und aus dem Knochenmark stammende dendritische Zellen und Makrophagen präsentieren im gesamten Thymus ständig Selbst-Peptide auf ihren MHC-Komplexen.¹⁷ Bindet eine sich entwickelnde T-Zelle sich mit ihrem TZR zu stark an diese Selbst-Peptide, wird die Apoptose initiiert und somit eliminiert.³³ Dieses Prinzip wird zentrale Toleranz genannt, da dadurch die autoreaktiven T-Zellen, also die T-Zellen, die gegen körpereigene Proteine gerichtet sind, vernichtet werden sollen.³⁴

1.2.4 Aktivierung der naiven T-Zellen und Prinzip der peripheren Toleranz

Hat eine T-Zelle die Selektion im Thymus überstanden, ist sie bereit, als naive T-Zelle den Thymus zu verlassen und über das Blut in ein sekundär lymphatisches Organ, wie z. B. einen Lymphknoten, auszuwandern. Insgesamt geht man davon aus, dass nur etwa 3% der sich entwickelnden T-Zellen die Selektion überstehen.^{35,36}

Im Lymphknoten angekommen, befindet sich die naive T-Zelle in der T-Zell-Zone (TZZ), die sich im Parakortex befindet. Dort kommt sie mit Antigen-präsentierenden-Zellen (APC), wie den dendritischen Zellen (DC), in Kontakt.³⁷ Erkennt eine naive T-Zelle mit ihrem TZR ein Antigen, das von einer DC auf einem MHC-Komplex präsentiert wird, wird eine T-Zell-Antwort ausgelöst. Es kommt zur sogenannten Prägung (Priming), bei dem mehrere Mechanismen zusammenspielen müssen.^{38,39}

Der erste Mechanismus ist der, dass die T-Zelle mit ihrem Rezeptor und dem Korezeptor in Wechselwirkung mit dem MHC-Komplex, der dendritischen Zelle, treten muss. Doch diese Bindung reicht noch nicht aus, um die naive T-Zelle zu aktivieren und zur Effektorzelle ausreifen zu lassen. Die dendritische Zelle muss mit kostimulierenden Molekülen mit der T-Zelle in Kontakt treten, wodurch die Proliferation der naiven T-Zelle veranlasst wird. Durch diese Interaktion der kostimulierenden Moleküle mit ihren Liganden, kommt es außerdem zur zeitlich abgestimmten Bildung von Zytokinen, die die Differenzierung für die CD4+-Zelle in die benötigten T-Helfer-Subpopulationen vorantreibt. Bleibt diese Kostimulation aus, wird die Proliferation und Differenzierung zur Effektorzelle unterdrückt.³⁹ Dies wird als ein Mechanismus der peripheren Toleranz bezeichnet, da es als weiterer Kontrollmechanismus wirkt, damit autoreaktive T-Zellen, die die Selektion im Thymus überstanden haben, nicht zur Proliferation und Ausreifung kommen.⁴⁰ Trotz dieser und weiteren Kontrollmechanismen kann es zur Entstehung von autoreaktiven T-Zellen kommen.⁵

Wie oben beschrieben, entscheidet das Zytokinmilieu, in welche Subpopulation sich die CD4+-Zelle entwickelt. Diese einzelnen Subpopulationen senden im Rahmen der Immunantwort verschiedene Zytokinmuster aus, wodurch bestimmte Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems aktiviert werden (Abb. 1.3).⁴¹

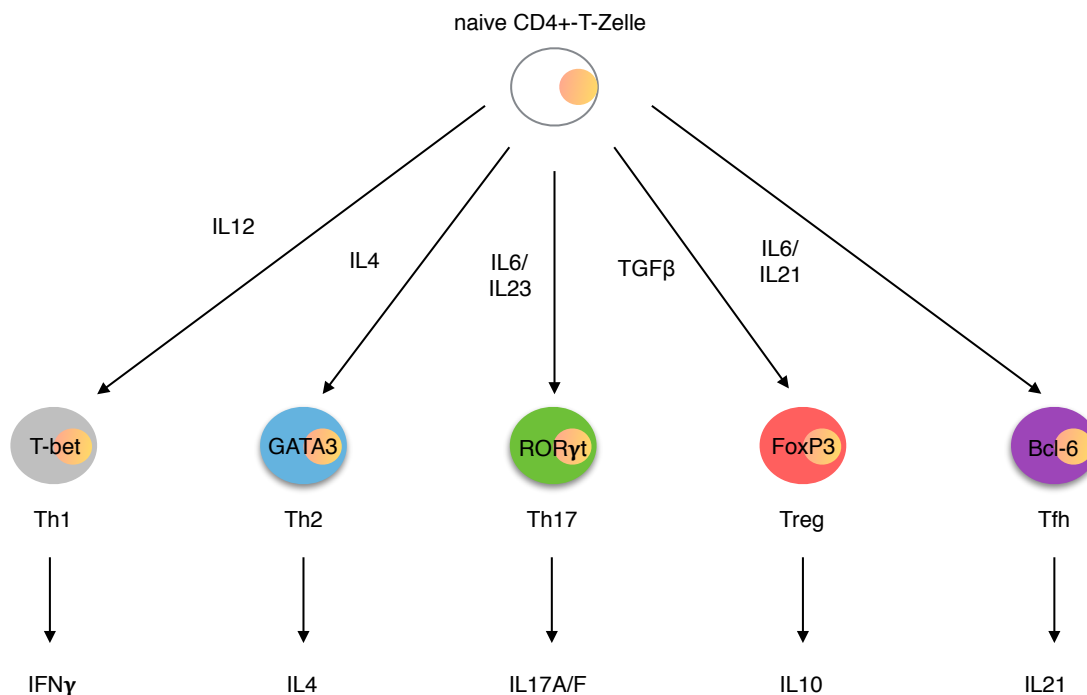


Abb.1.3 Differenzierung einiger T-Helferzellen-Subpopulationen

Die Differenzierung zu den einzelnen Subpopulationen werden durch die Sekretion verschiedener Zytokine der naiven CD4+-T-Zelle ausgelöst. Dabei konnten für jede Subpopulation spezifische Transkriptionsfaktoren ausfindig gemacht werden. Es kommt zur spezifischen Zytokinproduktion der einzelnen Th-Subpopulationen. Abbildung umgezeichnet nach Wambre E et al. (2012).⁴¹

Im Falle der Entwicklung der Tfh-Zelle handelt es sich um einen mehrstufigen und multifaktoriellen Prozess, an dem besonders B-Zell-Lymphom 6 (Bcl-6) und andere Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen.¹⁰ Es beginnt damit, dass eine naive CD4+-T-Zelle durch Präsentation ihres Antigens aktiviert wird. Es entscheidet sich nun in den ersten paar Runden der Zellteilung, welche Differenzierung die T-Zelle durchläuft. Wird der Chemokinrezeptor CXCR5 exprimiert, wandert die Tfh-Zelle an die Grenze des B-Zell-Follikels und differenziert dort weiter. CXCR5 ist ein Chemokinrezeptor, der zur Charakterisierung von Tfh-Zellen beiträgt. Erhält die Zelle stattdessen Th1-, Th2- oder Th17-Zellsignale, folgt sie einem von diesen Zelldifferenzierungsprogrammen. Dabei kommt es auch zur Hochregulierung von Chemokinrezeptoren für entzündliche Chemokine, die die Zelle dann dazu bringen, das lymphoide Gewebe zu verlassen und zum Ort der Entzündung zu wandern.¹⁰ Die frühe Differenzierung in Tfh-Zellen wird dabei vor allem über das Zytokin Interleukin 6 (IL-6), ICOS, IL-2 und zusätzlich wird noch die Signalstärke des TZR

eingeleitet. Die differenzierte Tfh-Zelle sezerniert nun ebenfalls Signalmoleküle. Dabei ist besonders Interleukin-21 (IL-21) interessant, da dieses als B-Zell-Helfer-Zytokin aufgefallen ist. Je nach Kostimulation scheint es die Differenzierung der B-Zellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen zu fördern, oder es induziert einen Immunglobulinklassenwechsel.¹¹

1.2.5 Die Tfh-Zelle als zentraler Ausgangspunkt der Autoimmunität

Die Mechanismen der zentralen und peripheren Toleranz spielen also sowohl in der Entwicklung der B- als auch in der der T-Zelle eine entscheidende Rolle. Kommt es hierbei zu Fehlern, steigt die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von autoreaktiven B- und T-Zellen.

Allerdings scheint durch die bereits beschriebenen Abhängigkeitsverhältnisse der B-Zell-Antwort von der T-Zell-Hilfe der zentrale Ausgangspunkt der Autoimmunität bei der T-Zelle und daher besonders der Tfh-Zelle zu liegen.

Es konnte gezeigt werden, dass trotz der genannten Regulationsmechanismen bei gesunden Personen autoreaktive B-Zellen bis zu 5-20% der zirkulierenden, reifen B-Zellen ausmachen.¹¹ Das bedeutet, dass autoreaktive B-Zellen nicht zwangsläufig zu einer Autoimmunerkrankung führen müssen. Dieses lässt sich mit dieser bereits beschriebenen Abhängigkeit erklären. Es verschiebt sich ein Teil der peripheren B-Zell-Toleranz auf die der T-Zelle. Denn wie in Kap. 1.1.1 beschrieben, kommt es nur in Anwesenheit einer autoreaktiven Tfh-Zelle zur Bildung von hochaffinen und langlebigen Autoantikörpern, die dann das Krankheitsbild auslösen können. Fehlt während der Prägung der B-Zelle die Hilfe von autoreaktiven Tfh-Zellen, geht die B-Zelle im Verlauf in Apoptose.¹¹

Somit wird deutlich, dass diese Tfh-Zellen eine enorme Wichtigkeit in der Pathogenese der Autoimmunität haben. Daher könnten sie auch eine große Rolle in Hinblick auf Entwicklung von Diagnostik und spezifischen Therapien gegen Autoimmunkrankheiten spielen.

Hierfür wäre es ein enormer Vorteil, wenn man die autoreaktiven Tfh-Zellen ausfindig machen könnte und die antigenspezifische Region ihres T-Zell-Rezeptors entschlüsseln könnte. Um diesem Ziel näher zu kommen, ist eine Repertoire-Analyse hilfreich.

1.3 Das T-Zell-Rezeptor-Repertoire und die Repertoire-Analyse

Bei dem T-Zell-Rezeptor Repertoire (TZR-Repertoire) handelt es sich dabei um die Gesamtheit aller T-Zellen und damit auch T-Zell-Rezeptoren eines Individuums. Durch die im Kapitel 1.2.1 beschriebenen Prozesse sind diese Rezeptoren sehr unterschiedlich und variabel. Berechnungen haben ergeben, dass theoretisch 10^{20} verschiedene T-Zell-Klonotypen möglichen wären. Tatsächlich wird aber davon ausgegangen, dass in der Maus gleichzeitig nur 5×10^6 verschiedenen T-Zell-Klonotypen existieren.⁴² Diese Zahlen vermitteln einen Eindruck davon, wie divers und groß das Repertoire ist. Diese einzelnen T-Zellen werden in der Repertoire-Analyse Klonotypen genannt, dabei entsprechen zwei T-Zellen mit derselben Rezeptorsequenz demselben Klonotypen.

Um einen umfassenden und systematischen Überblick von dieser Diversität zu bekommen und die einzelnen T-Zell-Klonotypen zu detektieren, eignet sich die Methode der *Next-Generation-Sequenzierung* (NGS), da man damit eine systematische Sequenzierung des TZR-Repertoires durchführen kann und dieses auch noch in relativ kurzer Zeit.⁴³

Eine wichtige Rolle hat dabei die Sequenzierung des TZR-Repertoires auf dem Gebiet der Autoimmunerkrankungen erlangt, da die Hoffnung besteht, so die auslösenden Momente zu finden oder die Pathogenese besser zu verstehen. Außerdem erhofft man sich, durch Repertoireanalysen neue Erkenntnisse zur Entwicklung von Diagnostik-Tools und individuellen und gezielte Therapien gegen Autoimmunerkrankungen zu entwickeln.^{44,45} Man könnte sich dabei z.B. die Rezeptorsequenz von gefundenen sicher autoreaktiven Zellen zunutze machen und diese dann gezielt zu depletieren. Dazu kann man bei Repertoireanalysen z.B. nach akkumulierenden Klonotypen in einem Individuum suchen. Also einzelnen Klonotypen mit besonderen Merkmalen, die besonders häufig in einem Individuum vorkommen.

Außerdem kann man die Diversität des gesamten Repertoires zwischen verschiedenen Individuen analysieren. Dabei wird bei Repertoireanalysen oft von privaten TZR-Klonotypen (*eng. private T-cell-receptor clonotypes*) gesprochen, also solchen Klonotypen, die nur in einem oder wenigen Individuen vorkommen, oder von öffentlichen TZR-Klonotypen (*engl. public T-cell-receptore clonotypes*), die bei einer Immunantwort in der Mehrheit der Individuen zu finden sind. Es wird davon

ausgegangen, dass die meisten Immunreaktionen sowohl private, wie auch öffentliche Klonotypen hervorrufen.⁴⁶

Neue Ergebnisse bei der Erforschung des TZR-Repertoires bei rheumatoider Arthritis (RA) und systemischem Lupus erythematodes (SLE) haben gezeigt, dass die Sequenzierung des TZR-Repertoires in naher Zukunft geeignet sein könnte, um sie als zuverlässiges Diagnosewerkzeug einsetzen zu können.⁴⁴ Dabei wurden im Repertoire des Blutes deutliche Veränderungen der Benutzung der V- und J-Gensegmente zwischen Gesunden und Patienten mit SLE oder RA gefunden.⁴⁴ Andere Studien zeigten bei der Analyse des TZR-Repertoires in Hautläsionen bei Patienten mit Psoriasis keine spezifischen Akkumulationen und ein sehr diverses Repertoire.⁴⁷ Dagegen konnte bei der Analyse des TZR-Repertoires in Blutproben bei Patienten mit SLE gezeigt werden, dass die Diversität des Repertoires im Vergleich zu gesunden Probanden deutlich abnimmt.⁴⁸

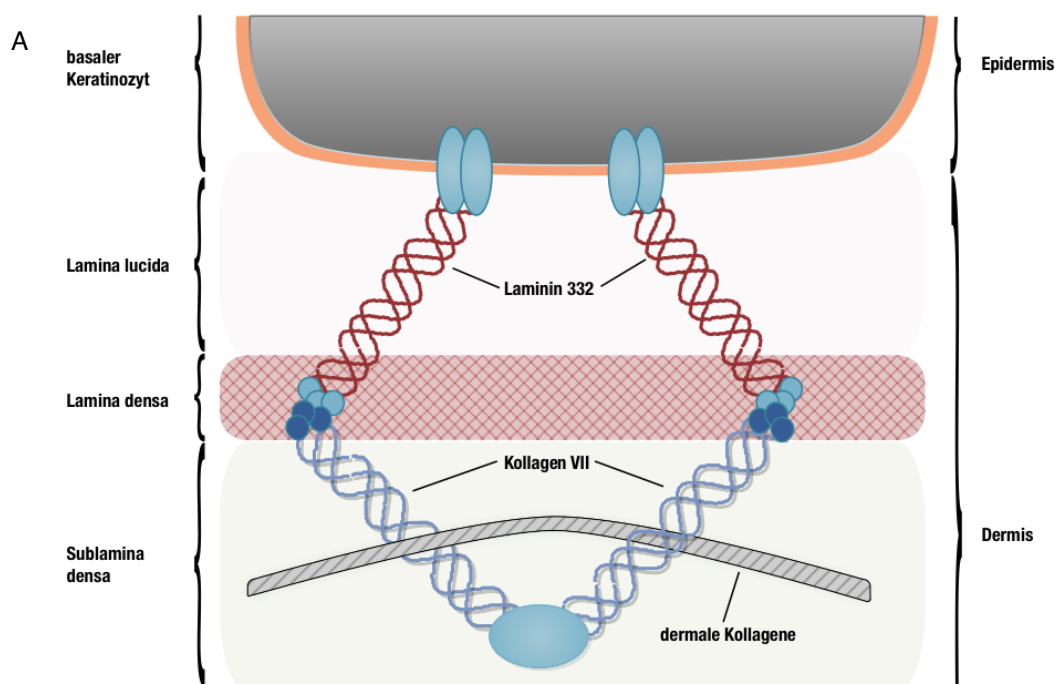
Repertoireanalysen von Tfh-Zellen sind insgesamt noch recht selten. Eine schon vorliegende Repertoireanalyse von Tfh-Zellen gewonnen aus Milzen von Mäusen zeigte bisher, dass das Repertoire verglichen mit nicht-follikulären T-Zellen zwar nicht so divers ist, aber trotzdem noch sehr vielfältig ist. Allerdings konnte nach einer Immunisierung keine signifikante Änderung dieser Diversität festgestellt werden und eine spezifische Antwort auf ein Antigen war nur schwach ausgeprägt.⁴⁹ Eine weitere Repertoireanalyse von Tfh-Zellen, gewonnen aus Milzen von Mäusen, die einen SLE-Phänotypen zeigten, zeigt eine Zunahme der Diversität unter Autoimmunität.⁵⁰ Um daraus aber wirklich Schlüsse für ein individuelles Immunmonitoring zu ziehen, braucht es noch mehr Daten und Erfahrung auf dem Gebiet. Besonders da deutlich geworden ist, wie groß und divers das Repertoire ist, und dass eine spezifische Immunantwort oder gar das Detektieren von autoreaktiven Zellen eine große Herausforderung darstellt.

1.4 Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) eine durch Autoantikörper vermittelte Autoimmunerkrankung

Als eine durch Autoantikörper vermittelte Dermatose eignet sich die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) besonders zum Erforschen des Tfh-Rezeptor-Repertoires, da bereits Modelle etabliert wurden, um diese Erkrankung bei Mäusen zu induzieren

und das Autoantigen bekannt ist. Außerdem handelt es sich um eine Dermatose und die Symptome sind ohne tiefere Untersuchung sichtbar.

Bei der EBA handelt es sich um eine bullöse Autoimmundermatose. Die Autoantikörper sind bei EBA gegen Kollagen VII (COL7) gerichtet, welches eine wichtige Komponente der Ankerfibrillen der dermalen-epidermalen-Junktionszone (DEJ) ist.^{51,52} Durch die Bindung der Autoantikörper kommt es zu einer Entzündungsreaktion in der Haut, die in subepidermaler Blasenbildung zwischen der Lamina densa der Basalmembran und der Sublamina densa endet (Abb1.4).



B

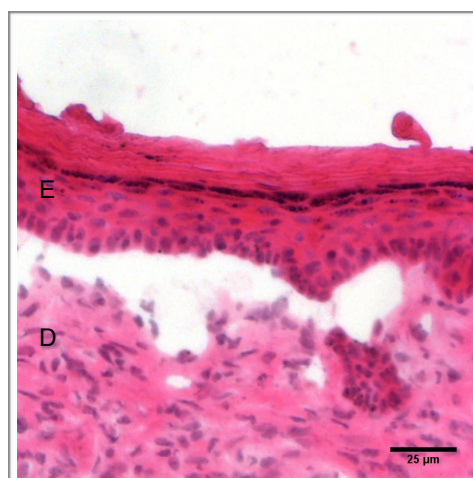


Abb.1.4 Kollagen VII verankert die dermalen Kollagene in der Basalmembran

A) Vereinfachte schematische Abbildung der dermalen-epidermalen Junctionszone. Kollagen VII verwebt die dermalen Kollagene mit der Lamina densa der Basalmembran und verankert diese so in der Basalmembran. Wird Kollagen VII durch die Antikörper gebunden, kommt es zur Entzündungsreaktion und zur Blasenbildung zwischen der Lamina densa und der Sublamina densa. B) Ausschnitt mit HE gefärbter Haut einer an EBA erkrankten Maus. Es kommt zum Abheben der Epidermis (E) von der Dermis (D). Maßstabsbalken $\approx 25\mu\text{m}$

COL7 ist ein Homotrimer, bestehend aus drei α -Ketten, die sich in einer Triplehelix anordnen. Jede dieser α -Ketten setzt sich dabei aus einer zentralen Kollagendomäne und zwei nicht-kollagen Domänen (NC-Domänen), von denen sie eingerahmt wird, zusammen. Die aminoternale NC1-Domäne ist 145 kD groß und umfasst mehrere Subdomänen. Die carboxyterminale NC2-Domäne ist hingegen nur 34kD groß. Die Subdomänen der NC1-Domäne bestehen aus einer Knorpelmatrixproteindomäne (CMP), neun fibronectin III-ähnlichen Domänen und einer cystein-reichen Domäne, die *von-Willebrand-factor-A-like-domaine-2* (vWFA2) (Abb1.5 A). Es wird davon ausgegangen, dass diese Subdomäne vWFA2 wesentlich für die Stabilisierung der Tripelhelix verantwortlich ist.^{53,54} Außerdem richten sich die meisten Antikörper bei EBA Patienten gegen Regionen dieser NC1-Domäne.^{55,56}

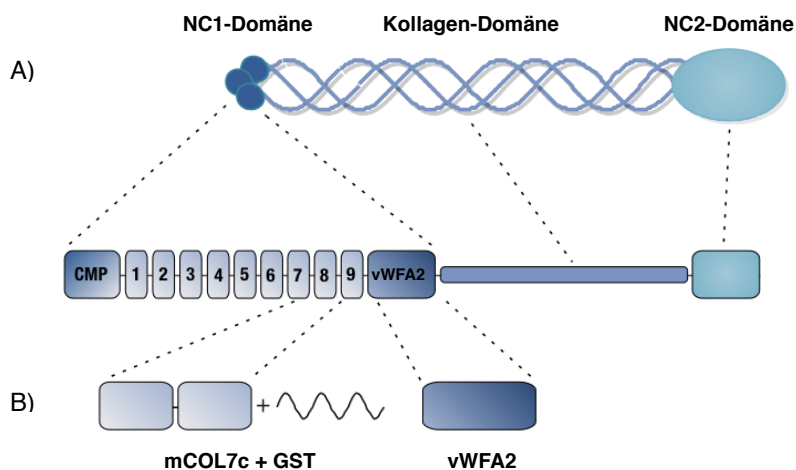


Abb.1.5 Schematischer Aufbau von Kollagen VII und Peptide zur Immunisierung

A) Kollagen VII setzt sich aus drei α -Ketten zusammen, die sich in einer Trippelhelix anordnen. Diese Ketten bestehen aus einer zentralen Kollagen-Domäne und zwei nicht-kollagenen Domänen (NC1 und NC2). Die N-terminale NC1-Domäne schließt mehrere Subdomänen ein. Die Subdomänen bestehen aus einer Knorpelmatrixproteindomäne (CMP), neun fibronectin III-ähnlichen Domänen und einer cystein-reichen Domäne, die *von Willebrand A like domaine 2* (vWFA2).

B) Zur aktiven Immunisierung können bislang zwei verschiedene Peptidfragmente aus der NC1-Domäne genutzt werden. Zum einen mCOL7c, welches aus Teilen der fibronectin III-ähnlichen Domänen und einem GST-Fusionsprotein besteht, und zum anderen aus der *von Willebrand A like domaine 2*, welches ohne Fusionsprotein zur Immunisierung genutzt werden kann.

Abbildung umgezeichnet nach Leinweber et al. (2011).⁵⁴

Um die Krankheitsursachen zu erforschen und mögliche Therapien zu entwickeln, wurden Methoden entwickelt, um bei Tieren die Krankheit zu induzieren. Dabei gibt es sowohl passive als auch aktive Methoden. Bei der passiven Methode werden Autoantikörper gegen COL7 aus den Seren von EBA Patienten extrahiert und in immunkompetente Mäuse gespritzt. Diese entwickeln daraufhin die obengenannten Symptome der EBA.^{57,58} Bei dem aktiven Modell gibt es bisher zwei Möglichkeiten, bei den Mäusen EBA zu induzieren. Dabei werden verschiedene Regionen aus der NC1-Domäne des COL7 als Autoantigen genutzt.

Bei der ersten aktiven Methode wird mit einem rekombinanten Peptidfragment aus den fibronectin III-ähnlichen Domänen 7 und 8 aus der immunogenen NC1-Domäne von murinem COL7 (mCOL7c) immunisiert (Abb. 1.5 B).^{59,60} Das mCOL7c ist dabei mit einer Glutathion S-Transferase (GST-Fusionsprotein) verbunden. Dieses GST-Fusionsprotein ist xenogen und kann somit als Xenoantigen wirken. Es konnte bereits von Tiburzy et al. gezeigt werden, dass eine mCOL7c-spezifische Antwort der Plasmazellen von T-Zellen initiiert wird, die spezifisch das GST-Fusionsprotein erkennen. Außerdem wurden Hinweise gefunden, dass das GST-Fusionsprotein wichtig für die Induktion der Krankheit sei und somit bei dieser Methode auch zur Pathogenität beitrage.⁶¹ So würde bei dieser Methode die Immunantwort nicht auf einem reinen autoimmunen Vorgang beruhen.

Bei der zweiten Methode werden die Mäuse mit einem rekombinant hergestellten murinen vWFA2 immunisiert (Abb 1.5 B). Der Vorteil dieser Methode ist es, dass dieses Peptid ohne jegliches Fusionsprotein zur Immunisierung vorliegt, also einem reinen Selbstpeptid entspricht, und somit auch die Antikörperproduktion nur durch dieses Selbstpeptid ausgelöst wird.⁶⁰ Es ist damit eine ausschließlich von einem Autoantigen ausgelöste Immunreaktion, die nicht durch ein Xenoantigen beeinflusst wird.

1.4.1 Repertoiranalyse von Tfh-Zellen bei an EBA erkrankten Mäusen

Bei EBA konnte bereits von Niebuhr gezeigt werden, dass Veränderungen im Tfh-Repertoire durch die Erkrankung mit EBA bei Mäusen aufgezeigt werden können und dass einzelne Tfh-Lymphozyten bei Immunisierung akkumulieren, besonders solche, die ein V3-Segment in ihrem Rezeptor benutzen.⁶² Für diese Repertoireanalyse wurden die Mäuse mit mCOL7c immunisiert. Wie bereits beschrieben, handelt es sich hierbei um ein Peptidfragment, welches mit einem GST-Fusionsprotein verbunden ist. Das Problem an dieser Methode ist, dass nicht unterschieden werden kann, ob sich die Immunantwort gegen das eigentliche Peptidfragment aus der immunogenen NC1-Domäne handelt oder gegen das GST Fusionsprotein. Somit ist nicht ausgeschlossen, dass die gezeigten Veränderungen im Repertoire wirklich ausschließlich auf die Autoimmunität zurückzuführen sind, oder ob die gezeigte Veränderung besonders durch dieses GST Fusionsprotein generiert wird.

Somit wäre es interessant zu erfahren, in welchem Umfang und ob überhaupt Veränderungen im Tfh Rezeptorrepertoire festzustellen sind, wenn eine Methode benutzt wird, bei der ein reines Autoantigen eingesetzt wird, wie es bei der Immunisierung mit vWFA2 der Fall ist.

1.5 Ziel und Fragestellung dieser Arbeit

Bei Autoimmunerkrankungen greift das Immunsystem den eigenen Körper an. Dieses kann entweder durch autoreaktive T-Zellen oder durch Autoantikörper ausgelöst werden.⁵ Obwohl es sich bei EBA um eine durch Autoantikörper induzierte Erkrankung handelt,⁵² liegt der Ausgangspunkt für die Entstehung der Krankheit bei den Tfh-Zellen in den Keimzentren (vgl. Kap. 1.2.5).^{6,8,11} Daher sind diese Zellen für eine Repertoireanalyse besonders interessant. Die Diversität ist verglichen mit

anderen T-Zell-Subpopulationen geringer und es ist bereits bekannt, dass ihre Differenzierung stark von der TZR-Signalstärke abhängt und daher angenommen wird, dass diese Zellen antigenspezifisch sind.¹¹

Ähnliche Untersuchungen zum Tfh-Repertoire wurden in der Arbeitsgruppe schon mit einem anderen Autoantigen (mCOL7-GST) und einem anderen Mausstamm (SJL) gemacht.⁶²

Das Ziel meiner Arbeit war es, diese Ergebnisse mit einer anderen Domäne des COL7, dem vWFA2 in einem anderen Mausstamm (C57BL6) zu verifizieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Abbildung in die dazu publizierte Arbeit aufgenommen.⁶³

Somit ist das Ziel dieser Arbeit, durch die Analyse des Tfh-Zellrezeptor- β -Repertoires der Keimzentren, Hinweise auf autoreaktive Tfh-Zellen zu bekommen. Die Keimzentren wurden dabei aus den poplitealen Lymphknoten von Mäusen gewonnen, die durch eine Immunisierung mit vWFA2 an EBA erkrankt waren.

Dabei sollen vorrangig diese Fragen geklärt werden:

- (I) Können Veränderungen im T-Zellrezeptor- β -Repertoire der Keimzentrens Tfh-Lymphozyten in dem aktiven Modell der EBA bei Immunisierung mit vWFA2 gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden?
 - Können akkumulierende Tfh-Zellrezeptor- β -Klonotypen in den Keimzentren gefunden werden?
- (II) Nimmt die Diversität nach Immunisierung mit vWFA2 ab?
 - Können mehr öffentliche Tfh-Zellrezeptor- β -Klonotypen unter Autoimmunität zwischen den Mäusen gefunden werden?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Die Tabellen mit den benutzten Materialien sind im Anhang in 7.1-7.7 zu finden.

2.2 Experiment

2.2.1 Versuchstiere und Haltung

Für die durchgeführten Versuche wurden kongene Mäuse des C57BL/6 Stammes mit einem H2.s des SJL/J Stammes benutzt (C57BL/6s syn. B6.SJL-H2s), die von dem Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie der Universität zu Lübeck zur Verfügung gestellt wurden. Die Tierhaltung erfolgte unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in der zentralen Tierhaltung der Universität zu Lübeck. Sie können Wasser und Standardfutter ad libitum beziehen. Durch eine Zeitschaltautomatik wurde ein 12-stündiger Hell-Dunkel-Rhythmus gewährleistet. Die Tierversuche waren vollständig von der zuständigen Landesbehörde, dem Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung und dem Tierschutzbeauftragten der Universität zu Lübeck genehmigt. Es wurde dafür folgender Tierversuchsantrag genehmigt:

V242-45884/2016 (90-7/16) Charakterisierung des vWFA2-induzierten EBA-Modells der Maus und Untersuchung des Einflusses mechanischer Reizung auf die Wundentstehung

Da die Promovierende keine Berechtigung zum tierexperimentellen Arbeiten besitzt, wurden alle Handlungen an den Versuchstieren durch Fachkundige durchgeführt. Die Tiere wurden dabei nach dem Zufallsprinzip für die Versuchsgruppen ausgewählt und in gemeinsamen Käfigen gehalten, um Verfälschungen zu vermeiden.

2.2.2 Validierung des rekombinanten Proteins

Das für die Immunisierung der Versuchstiere genutzte Protein, *von-Willebrand-factor-A-like-domaine-2* (vWFA2), wurde von dem Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie zur Verfügung gestellt und nach Leinweber et al. rekombinant hergestellt und aufgereinigt.⁶⁰ Um die Konzentration und Reinheit des

Proteins zu überprüfen, wurde vor der Anwendung eine diskontinuierliche und denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt (Abb. 2.1).⁶⁴ Die Durchführung erfolgte dabei durch Mitarbeiter des Instituts für Biologie. Dabei sollte die Masse 22,8kDa betragen.

Für die Durchführung wurden die Proben mit PAGE Probenverdünnungspuffer bei 95°C 5min vollständig denaturiert. Daraufhin wurde ein Volumen von 5µl pro Probe in die einzelnen Taschen des diskontinuierlichen NuPAGE 4-12% Bis-Tris Proteingels geladen. Es wurde eine Spannung von 200V für 35min zur Auftrennung angelegt. Im Abschluss wurden die Taschen entfernt und die Proteine wurden für 2 Stunden in 15% Essigsäure fixiert. Die Färbung wurde mit Coomassie-Blue für 15min durchgeführt.⁶⁵ Um überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurde das Gel im Anschluss viermal nacheinander mit Coomassie-Blue-Entfärbelösung für 30 Minuten gewaschen. Zum Schluss wurde es dann noch einmal mit auf Laborniveau aufgereinigtem H₂O o/n gespült. Zur Visualisierung wurde das *Odyssey Infrared Imaging System* genutzt. Zum Vergleich lief ein boviner Serumalbumin-Standard (BSA) mit. Da für die Immunisierung eine Mischung aus verschiedenen Präparationen des Proteins genutzt wurde, wurden diese jeweils getrennt auf Reinheit analysiert. Bis zur Anwendung wurden die Proteine bei -80°C gelagert.

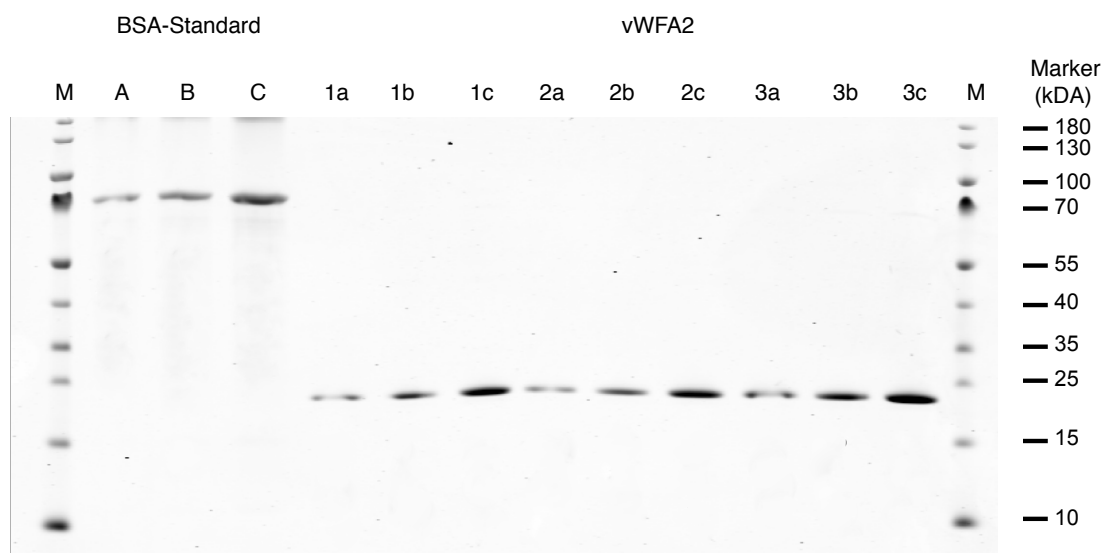


Abb 2.1 Diskontinuierliche und denaturierte Polyacrylamid-Gelelektrophorese des rekombinant hergestellten und für die Immunisierung benutzten vWFA2

Zum Vergleich lief ein BSA-Standard (berechnete Masse von 66,5kDa) in verschiedenen Verdünnungen mit auf den Bahnen A-C. ($A \triangleq 0,5\mu\text{g}$, $B \triangleq 1\mu\text{g}$ und $C \triangleq 2\mu\text{g}$). Da für die Immunisierungen ein Gemisch aus verschiedenen Aufbereitungen (1-3) des Proteins genutzt wurden, wurden diese in verschiedenen Verdünnungen (a-c) analysiert ($a \triangleq 0,2\mu\text{l}$, $b \triangleq 0,4\mu\text{l}$ und $c \triangleq 0,8\mu\text{l}$). Zum Massenvergleich lief eine vordefinierte PAGE-Leiter mit (M). An der rechten Seite sind die definierten Massen angezeigt.

2.2.3 Immunisierung und Verlauf

Die Immunisierung erfolgte im Alter von ca. 11 Wochen. Dazu wurde den Mäusen eine Emulsion aus vWFA2 und Titermax in einer Konzentration von $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ injiziert. Die Emulsion wurde hierfür unter sterilen Arbeitsbedingungen in einer Sterilwerkbank bei ständiger Kühlung hergestellt. Die Kontrollgruppe wurde mit einer 50%igen PBS-Lösung in Titermax behandelt. Dabei wurden die Immunisierungsansätze unmittelbar vor der Immunisierung für 30-40min bei 4°C durch einen Vortexmischer emulgiert.

Zur Immunisierung wurden die Tiere 20-30min durch eine Mischung aus Ketamin und Xylazin narkotisiert. Damit die Augen während der Narkose nicht austrockneten, wurden diese mit Bepanthen bedeckt und die Tiere wurden im Anschluss noch bis zum vollständigen Erwachen betreut.

Von den hergestellten Stocklösungen wurde den Tieren dabei jeweils $60\mu\text{L}$ subkutan in beide Hinterpfoten injiziert.

Eine Woche vor der Beendigung des Versuches wurde den Tieren mit einer mechanischen Nagelpfeile eine etwa gleichgroße nicht blutende Wunde an der Innenseite der Ohren zugefügt. Somit wurde nur die Epidermis entfernt und die Dermis blieb intakt.⁶⁶ Auch für diese Manipulation wurden die Tiere wie oben beschrieben anästhesiert.

Eine Beurteilung des Krankheitsverlaufes fand nach Bieber et al. statt.⁶⁷ Dazu wurde ab der 3. Woche wöchentlich ebenfalls in Narkose die betroffene Hautoberfläche genau betrachtet und die Größe und Ausdehnung getrennt in verschiedenen Körperregionen abgeschätzt und daraus ein Score gebildet. Diese Abschätzung wurde dabei jedes Mal von der gleichen Person durchgeführt.

2.2.4 Organentnahme

Die Mäuse wurden fünf Wochen nach der Immunisierung mit Kohlenstoffdioxid, wodurch es zu einer starken Asphyxie kam, in eine tiefe CO₂-Narkose versetzt. Danach wurden die Mäuse gewogen und auf dem Rücken liegend auf einer Korkplatte fixiert. Nach Anfeuchten des Fells mit 70%igem Ethanol, wurde das Bauch- und Brustfell mit einer Präparierschere aufgeschnitten und stumpf zur Seite präpariert. Parasternal wurde der Thorax eröffnet, aufgespreizt und mit einer 1ml Spritze mit dicker Kanüle das Blut aus dem Herzen abgenommen, wodurch ein absoluter Volumenmangel resultierte.

Zügig wurde im Anschluss das Peritoneum vom Prozessus xiphoideus bis zur Symphysis pubica geteilt und seitlich mit Nadeln fixiert. Nacheinander wurden die rechten und linken poplitealen Lymphknoten herauspräpariert und von umliegendem Binde- und Fettgewebe gereinigt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in, zuvor in Stickstoff gekühlte, Kryoröhrchen gefüllt. Die organgefüllten Kryoröhrchen wurden bis zur endgültigen Lagerung bei -80°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zusätzlich wurden die Ohren abgetrennt und nach dem gleichen Schema schockgefroren und gelagert.

2.3 Färbung von Gefrierschnitten der Haut

Die Ohren wurden in Einbettmedium (Leica) eingebettet und bei -20°C mit einem Serienschrittmikrotom (Carl Zeiss) in 12µm dicke Schnitte geschnitten und auf einen Objektträger gebracht und bei Raumtemperatur für mindestens 1 Stunde getrocknet. Die Anfertigung der Gefrierschnitte und die Färbungen wurden dabei von Mitarbeitern des Instituts für Anatomie durchgeführt.

2.3.1 Immunhistochemische Färbungen

2.3.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um eine Übersicht von den histologischen Strukturen zu bekommen, wurde eine Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) durchgeführt. Zunächst wurden die Schnitte mit einer Lösung aus Aceton und Methanol (1:1) für 10min bei -20°C fixiert und im Anschluss zweimal für 5min mit PBS gespült. Daraufhin wurden die Schnitte mit Hämatoxylin (1:5 mit PBS verdünnt) für die Kernfärbung für 10min inkubiert, überschüssiger Farbstoff wurde mit PBS für 5min abgewaschen und anschließend 10

min in PBS gebläut. Danach folgte ein Spülvorgang mit aqua dest. Zum Färben der alkalischen Zellstrukturen wurde der Farbstoff Eosin für 1-3min inkubiert und überschüssiger Farbstoff durch 5minütige Spülung mit aqua dest. entfernt. Zum Schluss wurden die Schnitte mehrfach in aufsteigender Alkoholkonzentration (70%-99,8% Ethanol) und dreimalig mit Xylol für 2-3min. gebadet und mit Entellan eingedeckt.

2.3.1.2 GR-1 Färbung

Zur Darstellung der Entzündungsreaktion, besonders hervorgerufen durch die neutrophilen Granulozyten, wurde eine Färbung mit dem granulozyten Marker GR-1 durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte für 10min mit einer Lösung aus Aceton und Methanol (1:1) bei -20°C fixiert. Anschließend wurde mit TBS-Tween zweimal für 5min gespült. Daraufhin wurden die Schnitte mit dem GR-1 Antikörper gegen murine Strukturen für 1 Stunde inkubiert und wieder zweimal mit TBS-Tween für 5min gespült. Als sekundärer Antikörper wurde der biotylinierte antiratten IgG-Antikörper hinzugegeben und für 30min inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit TBS-Tween für 5min entfernt. Zur Konjugation wurde ExtrAvidin-Alkaline Phosphatase für 30min dazugegeben und Überstand durch zweimaliges Spülen mit TBS-Tween 5min gewaschen. Zur Färbung der neutrophilen Granulozyten wurde Fast Red benutzt. Die Schnitte wurden 25min in dem Farbstoff gebadet und danach zweimal mit TBS-Tween 5min gespült. Zusätzlich wurden die Schnitte für 20sek-2min mit Hämatoxylin gefärbt und durch ein 10minütiges Bad in PBS gebläut. Zum Schluss folgte ein zweimaliges Spülen mit PBS und das Eindecken mit Aquatex.

2.3.2 Immunfluoreszenzfärbung

Um die Autoantikörper an der DEJ sichtbar zu machen, wurde die direkte Immunfluoreszenz eingesetzt. Bei dieser Methode werden Antikörper im Gewebe von einem sekundären Antikörper gebunden. An diesen ist ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden, der bei Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge ein Emissionsmaximum hat. Dieses wird mit Hilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops sichtbar gemacht.

Für die Färbung wurden die Hautschnitte für 10min mit einer Lösung aus Aceton und Methanol (1:1) bei -20°C fixiert und mit TBS-Tween für 10min gespült. Im Anschluss wurden die Proben entweder mit dem antimaus-IgG-FITC-Antikörper oder mit Fluorescein zum Färben des C3 1 Stunde inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit TBS-Tween für 10min gewaschen. Es folgte die Kernfärbung mit DAPI 1:10.000 verdünnt für 5min und ein weiteres Waschen mit TBS-Tween für 10min. Nun waren die Schnitte fertig zum Eindecken mit Mowiol und wurden im Anschluss unter Lichtausschluss gelagert.

2.3.3 Mikroskopieren und Fotografieren der Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem Axiophot Lichtmikroskop gesichtet. Repräsentative Bereiche wurden aufgesucht und aufgenommen. Um in der Aufnahme eine gleichmäßige Beleuchtung zu erhalten, wurde diese zuvor nach Köhler eingestellt. Im Anschluss wurde ein Weißabgleich mit dem Hintergrund gemacht, und die Bilder wurden in der gleichen Belichtungszeit aufgenommen.

Die Fluoreszenzfärbungen wurden mit dem Axioskop 2 plus ausgewertet. Die Belichtungszeit und weitere Einstellungen wurden bei allen Aufnahmen gleich gewählt. Es wurde stets mit einer negativ-Kontrolle verglichen.

2.4 Lasermikrodissektion

Für die Lasermikrodissektion wurden 12µm dicke Schnitte der poplitealen Lymphknoten mit Toluidinblau gefärbt, um die Strukturen sichtbar zu machen. Vor der Färbung wurde der Objektträger 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt und die Schnitte aufgetragen. Bis zur Durchführung der Mikrodissektion wurden die Schnitte bei -80°C gelagert.

Um die einzelnen Kompartimente besser identifizieren zu können, wurden auf einem weiteren Objektträger dazwischenliegende Schnitte mit einem Proliferationsmarker (Ki-67) und zwei Oberflächenmarkern für die T- (bTCRβ) und B-Zellen (B220) gefärbt. So ist es durch den Abgleich der Schnitte möglich, die einzelnen Keimzentren sauber mit dem Laser auszuschneiden (Abb2.2). Dieses bietet den Vorteil, dass so nur Zellen, die sich im Keimzentrum befinden, mit in die Analyse eingehen. Zur Vergleichbarkeit der isolierten Keimzentren, wurde stets ein ähnliches Volumen

ausgeschnitten. Dieses errechnet sich aus der Fläche multipliziert mit der Schnittdicke.

Die isolierten Keimzentren wurden danach in 350µL Lysispuffer-RL gelöst und nach 30 minütiger Inkubationszeit bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

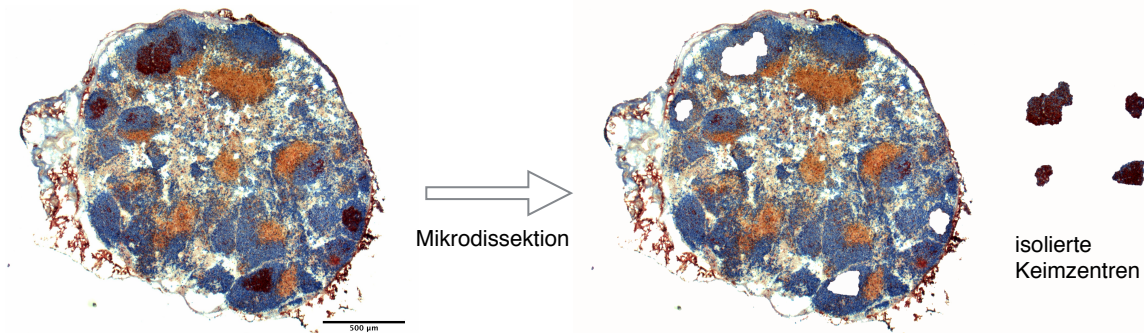


Abb.2.2 Isolierung der Keimzentren durch Lasermikrodissektion

Kryodissektionen der poplitealen Lymphknoten werden gefärbt, um die Strukturen identifizieren zu können. Mit Hilfe von Laserenergie werden im Anschluss ganz präzise nur die Keimzentren isoliert. Für die Lasermikrodissektion werden Schnitte gefärbt mit Toluidinblau benutzt. Für die deutlichere Illustration ist hier eine immunhistochemische Färbung gezeigt. B-Zell-Zone in blau (B220), T-Zell-Zone in braun (TZRβ) und in rot die Keimzentren (Ki-67), Maßstabsbalken \triangleq 500µm

2.4.1 Toluidinblaufärbung

Für die Toluidinblaufärbung wurden die Schnitte der Lymphknoten zunächst in 75% Ethanol für 10min fixiert und anschließend mit aqua dest. für 2min gespült. Nun folgte die Färbung mit 0,1%igem Toluidinblau für 2min und zweimaliges Spülen mit aqua dest. Zur Dehydrierung wurden die Schnitte im Anschluss in 96%igem Ethanol für 15sek. inkubiert. Die Schnitte wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

2.4.2 Ki.67, B220 und bTCRβ-Färbung

Die Kryoschnitte der poplitealen Lymphknoten wurden erst mit Chloroform für 10min und danach mit Aceton für ebenfalls 10min fixiert. Es folgte eine 10 minütige Spülung in TBS-Tween und anschließend wurden die Schnitte mit 4% PFA für 45min bei 4°C fixiert. Danach wurden sie 10min in TBS-Tween gewaschen. Nun wurde der Anti-Maus Ki67 Antikörper über Nacht auf die Schnitte gegeben. Ungebundene

Antikörper wurden durch Waschen in TBS-Tween für 10min entfernt. Der sekundäre biotinylierte anti-rat IgG-Antikörper wurde im Folgenden für 30min auf die Schnitte gegeben und ungebundene durch Spülung mit TBS-Tween entfernt. Im Anschluss wurde die ExtrAvidin Alkaline Phosphatase für 30min hinzugegeben und Überstehendes durch Spülung mit TBS-Tween für 10min entfernt. Als Farbstoff wurde Fast Red benutzt. Dieser wurde für 25min auf den Schnitten inkubiert, und ungebundener Farbstoff wurde durch 10min Spülung mit TBS-Tween entfernt. Für die Färbung der T-Lymphozyte, um bei der Mikrodissektion besser die T-Zell-Zone abgrenzen zu können, wurde zunächst biotinylierter Anti-Maus-Antikörper-TZR β für 1h auf die Schnitte gegeben. Ungebundener Antikörper wurde durch 10minütiges Spülen von TBS-Tween entfernt. Im Anschluss wurden die Proben mit ExtrAvidin Peroxidase für 30min inkubiert und der Überstand durch Waschen für 10min mit TBS-Tween entfernt. Angefärbt wurden die T-Lymphozyten mit flüssigem DAB+ für 5min und danach für 10min in TBS-Tween gespült. Um auch die B-Zell-Zone bei der Mikrodissektion abgrenzen zu können, wurden die B-Lymphozyten mit B220 angefärbt. Dazu wurde zunächst Anti-Maus-B220-Antikörper für 1h auf die Schnitte gegeben und ungebundene Antikörper durch Waschen in TBS-Tween für 10min entfernt. Als sekundärer Antikörper wurde biotinylierter Anti-Rat-IgG-Antikörper verwendet und dieser für 30min auf die Schnitte gegeben. Es folgte ein Waschschrift von 10min in TBS-Tween, in dem die ungebundenen Antikörper entfernt wurden. Nun wurde ExtrAvidin Phosphatase für 30min hinzugefügt und im Anschluss 10min mit TBS-Tween gewaschen. Als Farbstoff wurde Fast Blue benutzt. Ungebundener Farbstoff wurde durch Waschen mit TBS-Tween entfernt. Nach der Färbung wurden die Objektträger mit Aquatex eingedeckt.

2.5 RNA-Isolation

Die RNA Isolierung erfolgte mit dem innuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena). Dafür wurden entweder die isolierten Keimzentren auf 700 μ L mit Lysispuffer-RL aufgefüllt oder Gefrierschnitte von ganzen Lymphknoten (10 Stück je 12 μ m dick, in 700 μ L Lysispuffer-RL gelöst, bei -20°C gelagert) aufgetaut. Die Schnitte wurden zehnmal mit einer Feindosierungsspritze (Omnifix® F Solo 1ml, B.Braun) und Kanüle (Sterican® Gr.18, B. Braun) aufgezogen. Nach Zugabe und Durchmischen von 700 μ L Ethanol, wurde die Probe auf die Säule gegeben und abzentrifugiert bei 10.000 x g für eine

Minute. Der Durchfluss wurde bis zum Eluieren immer verworfen. Nach Waschen der Säulen mit hoch- und niedrigkonzentrierter Waschlösung und erneuter Zentrifugation bei 10.000 x g für 1 min, wurde die Säule durch eine Zentrifugation von 2 min bei 10.000 x g getrocknet. Im Anschluss wird die RNA eluiert. Dafür wurde die Säule in ein 1,5ml Reaktionsgefäß gestellt und 60µL nukleasefreies Wasser wurde auf die Säule gegeben und für eine Minute inkubiert, anschließend wurde für eine Minute bei 6.000g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut auf den Filter gegeben und 1 Minute inkubiert und zentrifugiert. Nun konnte der Filter verworfen werden. Durch Eindampfen mit einer Vakuumentrifuge (Konzentrator 5301, Eppendorf) wurde die gewonnene RNA konzentriert, bis die gesamte Flüssigkeit verdampft war. Für den anschließenden DNA-Verdau wurde die isolierte RNA in 8µL RNase-freiem Wasser gelöst und durch Zugabe von 1µL 10-fach DNase-Puffer und 1µL DNase gestartet. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, wurde der Verdau durch Zugabe von 1,5µL Stopp-Lösung (EDTA 15mM) durch kurzes Mischen und 10 minütige Inkubation bei 70°C gestoppt.

2.6 cDNA-Synthese

Nach dem DNA-Verdau schloß sich die cDNA Synthese an. Für diese wurde 8µL eines Mastermixes, bestehend aus 4µL 5xRT Puffer, 3µL nukleasefreiem Wasser, 1µL zufällige Hexamere und 1µL dNTPs, mit 0,5 µL reverser Transkriptase vermischt und zu den Proben gegeben. Die Proben wurden zunächst bei 25°C 10 min inkubiert und dann 60 min bei 42° in cDNA umgeschrieben. Für den Reaktionsstopp wurden die Proben 10 min auf 70°C erwärmt. Die fertige cDNA wurde bei -20°C bis zur Nutzung gelagert.

2.7 Quantitative Echtzeit PCR (qRT-PCR)

Zur Bestimmung der relativen Genexpression wird das Prinzip der quantitativen Echtzeit PCR genutzt.

Für die qRT-PCR wird ein Taq-Man Detektionssystem benutzt. Bei einigen Primern ist allerdings keine Sonde verfügbar, sodass dann die Sybr-green Fluoreszenzintensität gemessen wird.

Es wird für die PCR ein Ansatz aus 10µL 2x Taq-Man Mix oder Sybr-green Mix, 7µL Wasser, 1µL cDNA und 2 µL des Primer Mixes hergestellt. Der Primer Mix enthält im

Fälle des Taq-Man Systems folgende Konzentrationen: 0,9 μM Vorwärtsprimer, 0,9 μM Rückwärtsprimer und 100 μM der entsprechenden Sonde. Im Falle des Primer Mixes für Sybr-Green werden verschiedene Verdünnungen benutzt, entweder 0,25 μM für Vorwärts- und Rückwärtsprimer oder 0,5 μM .

Je nach Fluoreszenzdetektions-System werden verschiedene Protokolle genutzt, da bei dem Sybr-Green System zur Kontrolle vor Detektion von Fehlampifikation noch eine Schmelzkurve angefertigt wird. Das Schema für die cyclischen Einstellungen ist in Tabelle 2.1 und 2.2 zusammengefasst.

Tabelle 2.1 Zyklische Einstellung der quantitativen Echtzeit PCR bei Taq-Man

Temperatur [°C]	Zeit	Wiederholungen
95	10 min	
95	45 sek	50
60	1 min	
72	10 min	

Tabelle 2.2 Zyklische Einstellung der quantitativen Echtzeit PCR bei Sybr-Green

Temperatur [°C]	Zeit	Wiederholungen
95	10 min	
95	45 sek	50
60	1 min	
95	15 sek	In 0,5° Schritten
60-90	15 sek	
72	10 min	

Die Ergebnisse werden mit der Step One v2.3 Software analysiert. Es wird die relative Genexpression gemessen, indem der Ct-Wert (cycle threshold) bestimmt wird. Dieses ist der Wert, der die Anzahl der PCR-Zyklen, bei denen das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz überschreitet, entspricht.

Für die Quantifizierung werden Gene benötigt, die in den verwendeten Geweben unabhängig von den Versuchseinflüssen exprimiert werden, die sogenannten Haushaltsgene.⁶⁸ Es werden für die Analyse als Haushaltsgene MLN51, GAPDH und β -Actin verwendet.⁶⁹ Dabei wurde von Niebuhr gezeigt, dass diese unabhängig von

Versuchseinflüssen exprimiert werden.⁶² Von diesen Genen wird ebenfalls der Ct-Wert und daraus der Mittelwert gebildet. Dieser Mittelwert der Ct-Werte dieser drei Gene wird dann als Normalisierungsfaktor für die Berechnung der Expression der weiteren Gene verwendet.⁷⁰

Die Berechnung erfolgt nach dieser Formel:

$$N_F = \sqrt[3]{\overline{C_T} \text{ MLN51} * \overline{C_T} \text{ GAPDH} * \overline{C_T} \text{ } \beta\text{Actin}}$$

Der daraus errechnete Normalisierungsfaktor wurde für die Berechnung der relativen Genexpression benutzt.⁷¹ Diese wurde durch folgende Formel errechnet:

$$2^{\Delta C_T} = 2^{((N_F) - (\overline{C_T} \text{ einzelnes Gen}))}$$

Zur verständlicheren Abbildbarkeit und dadurch leichteren Vergleichbarkeit, wurde der errechnete ΔC_T -Wert durch den Mittelwert des ΔC_T -Wert der Kontrollgruppe geteilt, so wurde auf den ΔC_T -Wert der Kontrollgruppe normiert und liegt somit immer bei 1. Dieses wurde wie folgt berechnet:

$$2^{-\Delta \Delta C_T} = 2^{-\Delta C_T \text{ Versuchsgruppe}} / 2^{-\Delta C_T \text{ Kontrollgruppe}}$$

2.8 Sequenzierung

2.8.1 Quantifizierung der RNA-Menge

Zunächst wurde aus den durch die Mikrodissektion gewonnenen Keimzentren die RNA gewonnen und anschließend ein DNA-Verdau durchgeführt, wie in Absatz 2.4 beschrieben. Im Anschluss wurde die RNA mit Hilfe des Quantus-Fluorometer (Promega) quantifiziert. Dazu wurde zunächst eine 1x Verdünnung einer 20x TE Lösung hergestellt durch die Zugabe von 950 μ L PCR-Wasser zu 50 μ L 20x TE. Hiermit wurde dann die RNA 1:100 verdünnt, indem 99 μ L 1xTE, 1 μ L RNA hinzugefügt wurden. Der Farbstoff wurde in einer 1:1000 Verdünnung benutzt. (999 μ L 1xTE + 1 μ L Farbstoff). Nun wurde 100 μ L Farbstoffverdünnung zu der zuvor hergestellten RNA Verdünnung gegeben und nach sanftem Mischen und Zentrifugieren, für 5 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Fluoreszenz am Gerät. Durch den Vergleich mit zuvor gemessenen Standards berechnete das Gerät eine Konzentration.

2.8.2 Amplikon-rettende multiplex PCR

Zur Herstellung einer T-Lymphozytenrezeptor- β -Sequenzierungsbibliothek wird die Methode der Amplikon-rettende multiplex PCR (ARM-PCR) verwendet. Diese beinhaltet 2 verschiedene PCR Durchläufe, wobei bei der ersten PCR die kommerziell erworbenen 24 Vorwärts- und Rückwärts-Primer die verschiedenen T-Lymphozytenrezeptoren- β (TZR β) an ihren verschiedenen V- und C-Gen-Segmenten erkannt und amplifiziert werden. In der zweiten PCR werden universelle Illumina-Primer benutzt, die die Produkte aus der ersten PCR als Templates nutzen können, sodass es zur exponentiellen Amplifizierung der verschiedenen TZR β -Sequenzen kommt.

Vor der ersten PCR erfolgt die c-DNA-Synthese. Die anschließende Amplifizierung erfolgt mit dem Quiagen-One-Step-RT-PCR Kit (iRepertoire). Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Die eingesetzte RNA-Menge variiert bei maximal 500ng und wird auf 15 μ L mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Es wird ein Mastermix aus je 5 μ L 5xPuffer, 1 μ L dNTPs (10 μ M), 1 μ L Enzymmix und 3 μ L „MTBI“ Primer hergestellt. Für jede Probe wird ein anderer MTBI Primer verwendet, da dieser dazu dient, die Probe nach dem Sequenzieren zu identifizieren. Zu dem Mastermix werden jeweils 1 μ L der gewonnenen RNA oder für die NTC Wasser hinzugefügt.

Die erste PCR wird mit einer Primus 96^{plus} PCR Maschine (MWG Biotech) nach dem folgenden Schema (Tab. 2.3) durchgeführt:

Tabelle 2.3 Zyklische Einstellungen der Amplikon-rettende multiplex PCR

Temperatur [°C]	Zeit	Wiederholungen
50	40min	
95	15min	
94	30sek	15x
60	2min	
72	30sek	
94	30sek	10x
72	2min	
72	10min	

Im Anschluss an die erste PCR schließt sich die zweite PCR an. Dazu nimmt man 1µL des PCR Produktes und mischt dieses mit 9µL RNase freiem Wasser, 2,5µL Primer und 12,5µL Mastermix. Beides wird vom Hersteller dazu geliefert.

Schema für die zweite PCR (Tab. 2.4):

Tabelle 2.4 Zyklische Einstellungen der Amplikon-rettende multiplex PCR zur Amplifikation

Temperatur [°C]	Zeit	Wiederholungen
95	15min	
94	30sek	40x
55	30sek	
72	30sek	
72	5min	

2.8.3 Agarosegel-Elektrophorese

Um Verunreinigungen, wie Primer-Dimere, zu verringern, wird das Produkt aus der zweiten PCR auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen.

Um die DNA später im Gel sichtbar zu machen, wird zu 50 ml Gel 5µL Roti-GelStain (Roth) bei 65°C hinzugefügt. Nach Aushärten des Gels können die Proben aufgetragen werden.

Dafür wird sie mit 5µL loading buffer gemischt und in die Taschen des Gels gefüllt. Die anschließende Elektrophorese wird bei 110V für ca. 40 Minuten durchgeführt. Danach kann die Bande bei ca. 280bp (unter UV Licht sichtbar) ausgeschnitten werden. Diese Bande ist deutlich von der NTC zu unterscheiden.

2.8.4 DNA Gel-Elution

Aus der ausgeschnittenen Gelbande wird im Anschluss die cDNA eluiert mit dem MinElute Gel Extraction Kit (Quiagen). Hierzu müssen die Gelstücke zunächst gewogen werden, da sie im Anschluss mit dem dreifachen des Volumens mit Puffer QG gemischt werden und für 10 Minuten bei 50° unter ständiger Bewegung gelöst werden. Nach Hinzugeben des einfachen Volumens des Gels an Isopropanol, werden maximal 700µL auf die Säule gegeben und 1min bei 13.000g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Sollte noch Volumen übrig sein, wird der Rest ebenfalls

auf die gleiche Säule gegeben und die Zentrifugation wiederholt, der Durchfluss wird wieder verworfen. Im Anschluss werden 500µL Puffer QG auf die Säule gegeben und wieder 1 min bei 13000g zentrifugiert und der Durchfluss wird verworfen. Nun werden 750µL PE Puffer auf die Säule gegeben und für 3 Minuten inkubiert, sodass kürzere DNA Fragmente und Primerreste gelöst werden können. Nach den 3 Minuten wird erneut bei 13.000g 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nun wird die Säule zum Trocknen nochmals bei 13.000g für eine Minute zentrifugiert und im Anschluss in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. Die an der Säule gebundene DNA wird nun durch Hinzufügen von 10µL Puffer EB und Inkubation von 1 min. gelöst. Danach wird noch ein weiteres Mal bei 13.000g für eine Minute zentrifugiert. Im Anschluss wird die Säule verworfen. Der Durchfluss enthält die zuvor amplifizierten T-Zell-Rezeptor-β-Sequenzen.

2.8.5 Quantifizierung der cDNA-Menge

Bevor nun die Sequenzierung starten kann, muss zunächst die cDNA-Menge in den Proben quantifiziert werden. Dazu wird das PerfeCTa NGS Quantification Kit (Quantabio) benutzt. Dazu werden die Proben zuerst mit 1xPuffer in drei Schritten auf 1:10.000 verdünnt. Hierfür wird zunächst 1µL Geleluat mit 9µL 1xPuffer verdünnt, sodass eine Verdünnung von 1:10 entsteht, danach wird diese Verdünnung weiter auf 1:1000 verdünnt (1µL DNA und 99µL Puffer) und diese Verdünnung wird ein weiteres Mal auf 1:10.000 verdünnt (5µL DNA und 45µL Puffer). Für den PCR Ansatz werden nun 10µL PerfeCta Sybr Green Supermix, 0,6µL Illumina Primer Mix (10µM), 5,4µL nukleasefreies Wasser und 4µL der zuvor verdünnten DNA. Zusätzlich für die Quantifizierung werden verschiedene 5 Standards benutzt, um später die genaue DNA Menge der Probe ermitteln zu können.

Schema der durchgeführten PCR:

Tabelle 2.5 Zyklische Einstellungen der PCR zur Quantifizierung der cDNA-Menge

Temperatur [°C]	Zeit	Wiederholungen
95	5min	
95	20sek	35x
60	30sek	
72	45sek	

Die Ergebnisse der Amplifikation wurden mit der ABI 7900 HT detektiert. Die Baseline wurde dabei standardmäßig zwischen 3 und 8 und der Schwellenwert (threshold) immer auf 0,2 gesetzt. Mit Hilfe der Standards konnte von jeder amplifizierten Probe die Rohkonzentration berechnet werden. Daraus wurde, laut Herstellerangaben, die Library-Konzentration wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned} & \text{auf die Größe korrigierte Konzentration (pM)} \\ & = \text{Rohkonzentration (pM)} * \frac{\text{Fragmentlänge Standards(bp)}}{\text{Fragmentlänge Amplikons (bp)}} \end{aligned}$$

Dabei entspricht die Fragmentlänge der Standards bei dem benutzten PerfeCTa NGS Quantifikation Kit 426bp und für die der Amplikons, wie in Absatz 2.7.3 beschrieben, 280bp. Somit ergibt sich:

$$\text{auf die Größe korrigierte Konzentration (pM)} = \text{Rohkonzentration (pM)} * 1,52$$

Unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors ergab sich folgende Berechnung der Library-Konzentration:

$$\begin{aligned} & \text{Library Konzentration (nM)} \\ & = \text{auf die Größe korrigierte Konzentration (pM)} * 10.000 \end{aligned}$$

2.8.6 Herstellen einer Library

Die T-Lymphozytenrezeptor- β -Sequenzen werden mit dem Illumina MiSeq System analysiert. Es können bei dem System immer bis zu 6 verschiedene Libraries gleichzeitig sequenziert werden, da sie jeweils eine verschiedene Indexsequenz haben.

Für die Herstellung einer Sequenzier-Library wird zunächst eine 0.2 N Lösung Natronlauge (NaOH) hergestellt, dazu wird 1.0N NaOH Lösung auf 1:4 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt.

Die einzelnen Proben werden auf 2nM mit Tris/HCL verdünnt.

Nun werden 5µL von jeder Probe in ein Reaktionsgefäß pipettiert, sodass es zur Mischung aller Proben kommt. Nun werden 5µL von dieser Mischung mit 5µL der zuvor verdünnten NaOH vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA zu denaturieren.

Im Anschluss wird zu der denaturierten DNA 990µL Hybridisierungspuffer (HT1) hinzugegeben, sodass man eine Konzentration der Library von 10pM erhält.

Für die Sequenzierung wird eine Konzentration von 7,5pM benutzt, daher wird die 10pM Library nochmals mit HT1 verdünnt. Und zwar werden dazu 450µL 10pM DNA-Library mit 150µL HT1 vermischt.

Als Kontrolle der Cluster-Generierung wird eine dem Gerät bekannte Kontrolle einer Nukleotidsequenz dazugegeben (PhiX). So wird die Nukleotidabfolge diverser, und das Gerät kann die einzelnen Cluster besser voneinander trennen. Dieses muss zunächst auf 12,5pM verdünnt werden. Dazu wird die vom Hersteller gelieferte 10pM PhiX-Library zunächst auf 4 nM verdünnt. Dazu werden 2µL PhiX mit 3µL 10 mM Tris-Cl, pH 8.5 with 0.1% Tween 20 vermischt. Nun erfolgt ebenso eine Denaturierung der PhiX-Library mit 0,2 N NaOH. Dazu werden jeweils 5µL zusammengegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die nun in ihre Einzelstränge aufgetrennt PhiX-Library wird nun auf 20pM verdünnt. Dazu werden 10µL der PhiX-Library mit 990µL HT1 vermischt.

Diese wird für die Sequenzierung weiter auf 12,5pM verdünnt (375µL 20pM PhiX-Library und 225 HT1).

2.8.7 Durchführung der Sequenzierung

Zum Auftragen auf die Cartridge muss nun die verdünnte PhiX-Library mit der zuvor hergestellten Proben-Library vermischt werden. Hierzu werden 15% PhiX zu der Proben-Library gegeben, also 90µL PhiX (12,5 pM) und 510µL Proben-Library (7,5pM). Dieses wird nun komplett auf die Cartridge geladen und kann sequenziert werden.

Für die Sequenzierung wird der MiSeq™ V2 benutzt. Es wird eine 150bp paired end Sequenzierung dazu genutzt, d.h. es werden 150 bp von jedem der beiden Stränge (Vorwärts- und Rückwärtsstrang) sequenziert, wobei das Ende der beiden Stränge überlappt, so wird das sequenzierte Stück insgesamt länger. Die Sequenzierungsdaten werden als FASTQ Daten generiert und auf Grund der PhiX-Sequenzierungsqualität, der Dichte der Cluster und Clusterpassfilter bewertet. Dabei werden Sequenzierungsläufe mit einer Clusterdichte von $750\text{k}/\text{mm}^2 \pm 150$ und einer Clusterpassfilterrate von $>90\%$ als erfolgreich gewertet.

2.8.8 Aufbereitung der Sequenzierungsdaten

Die erfolgreichen Sequenzierungsläufe ergaben zwei getrennte FASTQ-Dateien, die die jeweiligen Ergebnisse für den Vorwärts- bzw. Rückwärtsstrang beinhalteten. Die folgende Datendemultiplexierung, Datenverarbeitung und TZR- β -Zuordnung erfolgte mit dem Programm ClonoCalc 2.1.⁷²

Das Programm sortiert zunächst die sechs verschiedenen Proben, die in einem Sequenzierlauf zusammen sequenziert wurden, auseinander. Dieses wird anhand der „MTBI“ Primer, die die einzelnen Proben nach ihrer probenspezifischen Indexsequenz demultiplexieren, durchgeführt. Im Anschluss werden zu den Vorwärtssträngen die entsprechenden Rückwärtstränge herausgesucht, dieses wird mit dem Programm KIEL gemacht, welches die Stränge anhand ihrer Koordinaten auffindet. Danach werden durch das Programm PEAR die an den Enden korrespondierenden Stränge gesucht und zusammengefügt.⁷³ Um den Fehler bei der Zusammenfügung der Stränge möglichst niedrig zu halten, werden die einzelnen Phred-Qualitätswerte der Reads erhoben, und bei einem Wert von <30 werden die Reads verworfen.⁷⁴ Die so erhaltenen zusammengefügt Reads werden durch das R package „MiTCR“ mit der imgt Datenbank verglichen, dem internationalen *ImMunoGeneTics information system*®, dabei werden die erhaltenen Reads durch Sequenz-Mapping gegen den murinen T-Lymphozytenrezeptor- β -Genlocus identifiziert.

Es werden dabei außerdem zu der entsprechenden CDR3 Region die genutzten V, D und J Segmente zugeordnet. Dadurch wird eine Tabelle mit den detaillierten TZR β Informationen generiert. Diese Tabelle beinhaltet somit die Anzahl der Reads, die Frequenz der Reads, die CDR3-Aminosäuresequenz, die VDJ-Gen-Segment Zuordnung

und die Anzahl der Nukleotidinsertionen. Die daraus abgeleiteten TZR β -Klonotypen entsprechen jeweils einer individuellen CDR3-Aminosäuresequenz.

2.8.9 Auswertung der Sequenzierungsdaten

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe von RStudio und basiert auf dem tcR-Paket oder Funktionen aus Clono Suite.^{75,76,72} Dabei wurden nur TZR β -Klonotypen berücksichtigt, bei denen die Anzahl der Kopien ≥ 2 entsprach.⁷⁷ Um die Wahrscheinlichkeit für Sequenzierungsfehler durch zum Beispiel PCR-Fehler⁷⁸ oder durch andere fehldetektierte T-Lymphozytenpopulationen möglichst gering zu halten, wurden in die spezifischen Analysen des Rezeptorrepertoires nur Klonotypen, die in ihrer Häufigkeit über dem Median liegen, einbezogen. Lediglich für die Analyse der Frequenzen, wurden alle Klonotypen berücksichtigt. Tabelle 7.8 gibt über die einzelnen Prozessierungsschritte der Klonotypen Aufschluss.

2.8.10 Berechnung der Indices

Für die Analyse des TZR β -Repertoires werden verschiedene Indices berechnet. Um die Gleichmäßigkeit der Häufigkeitsverteilung zu bewerten, wurde der Gini-Koeffizient benutzt. Dies ist ein statistisches Maß für die Ungleichverteilung und kann dabei Werte von 0 (\triangleq völlige Gleichverteilung, in diesem Falle also, dass alle Klonotypen gleich häufig vorkommen) bis 1 (\triangleq maximale Ungleichverteilung, in diesem Falle, dass ein Klonotyp das gesamte Repertoire abbildet) annehmen. Der Gini-Koeffizient leitet sich dabei aus der Lorenzkurve ($L(x)$) ab.⁷⁹

Und wird wie folgt berechnet:

$$G = 1 - 2 \int_0^1 L(x) dX$$

Als weiterer Index wurde der Jaccard-Index berechnet. Dieser ist ein Ähnlichkeitsmaß für Mengen und korrigiert dabei unterschiedliche Mengengrößen. Somit berechnet er das Verhältnis von gleichen Klonotypen zu individuellen Klonotypen zwischen den einzelnen Mäusen.⁸⁰ Der Jaccard-Index kann dabei Werte von 0 (\triangleq keine gleichen Klonotypen zwischen den Mäusen) bis 1 (\triangleq komplett gleiches Repertoire zwischen den Mäusen) annehmen.

Berechnet wird er wie folgt:

$$J(A, B) = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|}$$

A \triangleq Klonotypen von Maus A

B \triangleq Klonotypen von Maus B

Zusätzlich zu dem Jaccard-Index wurde auch noch der Morisita-Horn-Index berechnet. Er korrigiert nicht nur die verschiedenen Probengrößen, sondern bewertet zusätzlich die häufig vorkommenden überlappenden Klonotypen stärker. Somit ist dieser Index stärker auf die Gleichheit der hochfrequenten Klonotypen konzentriert.⁸¹ Er nimmt dabei Werte von 0 (\triangleq keine gleichen Klonotypen) bis 1 (\triangleq völlige Gleichheit des Repertoires zwischen den Mäusen)

Er wurde dabei wie folgt berechnet:

$$C_{MH} = \frac{2 \sum_{i=1}^s x_i y_i}{\left(\frac{\sum_{i=1}^s x_i^2}{X^2} + \frac{\sum_{i=1}^s y_i^2}{Y^2} \right) XY}$$

x_i \triangleq Anzahl der Klonotypen in Maus X

y_i \triangleq Anzahl der Klonotypen in Maus Y

s \triangleq Anzahl von einmalig vorkommenden Klonotypen

2.8.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit GraphPad Prism 6 durchgeführt. Dabei sind die Abweichungsbalken jeweils als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Als statistisch signifikant wurden Werte von * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ bewertet.

Es wurde dabei für die statistische Auswertung eine biometrische Beratung von dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck in Anspruch genommen.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Methode: Mäuse in Versuchsgruppe erkranken an EBA

Zur Klärung der Frage, wie sich das Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Repertoire bei Autoimmunität verändert, waren C57BL/6s Mäuse mit einem Autoantigen, dem von Willebrand Faktor A-like Domäne 2 (vWFA2), plus einem Adjuvants immunisiert worden. Eine Kontrollgruppe war mit einer Salzlösung (Phosphat-gepufferte Salzlösung=PBS) mit Adjuvants identisch behandelt. Das Adjuvants Titermax (TM) diente dabei dazu, um auch bei der Kontrollgruppe eine Immunreaktion auszulösen. In der dritten Woche begannen die Krankheitssymptome bei der Versuchsgruppe. Es kam zur Blasenbildung an Ohr und Schnauze, und das Fell fiel den Mäusen in diesen Regionen aus. Die Mäuse wurden einmal wöchentlich untersucht, und zur Quantifizierung wurde die Schwere und Ausbreitung der Symptome in einem Score festgehalten (Abb. 3.1 B). Auch nach fünf Wochen waren in der Kontrollgruppe keine Symptome der EBA zu erkennen (Abb. 3.1 C), die Versuchsgruppe hingegen zeigte die typischen Symptome (Abb. 3.1 D), sodass das Experiment wie geplant beendet werden konnte und die Mäuse getötet und die linken und rechten poplitealen Lymphknoten sowie die Ohren, entnommen wurden. Abbildung 3.1 A gibt über den genauen Ablauf Aufschluss.

Die Ohren wurden entnommen, um daran EBA zu diagnostizieren. Dieses wurde über das Anfärben der gebundenen Autoantikörper in der Haut gemacht. Außerdem wurden die popliteale Lymphknoten von beiden Seiten einzeln entnommen, da diese die kompletten Hinterläufe drainieren und somit hier die Immunreaktion beginnt.

A

Wochen	0	1	2	3	4	5
	Immunisierung		Scoring	Scoring	Scoring	Scoring
					Erzeugen von Kratzerosionen	Tötung und Entnahme von Ohren und pop. Lymphknoten

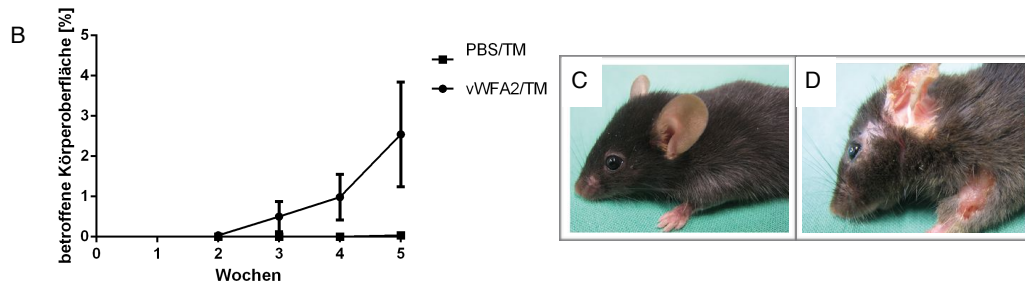


Abb 3.1 Aufbau des Experimentes mit Auftreten von Symptomen der EBA

C57BL/6s Mäuse wurden in den linken und rechten Hinterlauf mit vWFA2 in Titermax als Versuchsgruppe und PBS in Titermax als Kontrollgruppe immunisiert.

A) Eine Woche vor Beendigung des Experimentes wurde allen Mäusen eine Kratzerosion an den Ohren zugefügt. Nach 5 Wochen wurde das Experiment beendet und die beiden poplitealen Lymphknoten entnommen.

B) Einmal wöchentlich wurde die Schwere und Ausbreitung der Krankheit mit einem Score erhoben. Die Versuchsgruppe zeigte ab der dritten Woche progrediente Symptome.

C) Beispielhaft eine C57BL/6s Maus, wie sie in der Kontrollgruppe bei Beendigung des Experimentes aussah und D) Maus nach vWFA2/TM Immunisierung mit Fellverlust an Schnauze und Ohren und Blasenbildung. Abbildung C und D) aus Iwata et al. (2015).⁵⁸

3.1.1 Kratzerosion fördert Entzündungsreaktion

Um sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe den Einfluss einer Entzündungsreaktion miteinzuschließen, wurde beiden Gruppen eine Woche vor Beendigung des Experimentes eine von Größe und Wundtiefe vergleichbare Kratzerosion an der Innenseite des Ohres zugefügt. Dieses wurde am Ohr durchgeführt, da dieses eine Prädilektionsstelle für die Blasenbildung bei an EBA erkrankten Mäusen ist.

So kam es unabhängig von der Immunisierung in der Nähe der Erosion zu einer Entzündungsreaktion und damit zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Schwellung der Epidermis und Dermis. Doch nur in der Versuchsgruppe kam es zum Ablösen der dermoepidermalen Junktionszone und somit zur Blasenbildung (Abb. 3.2).

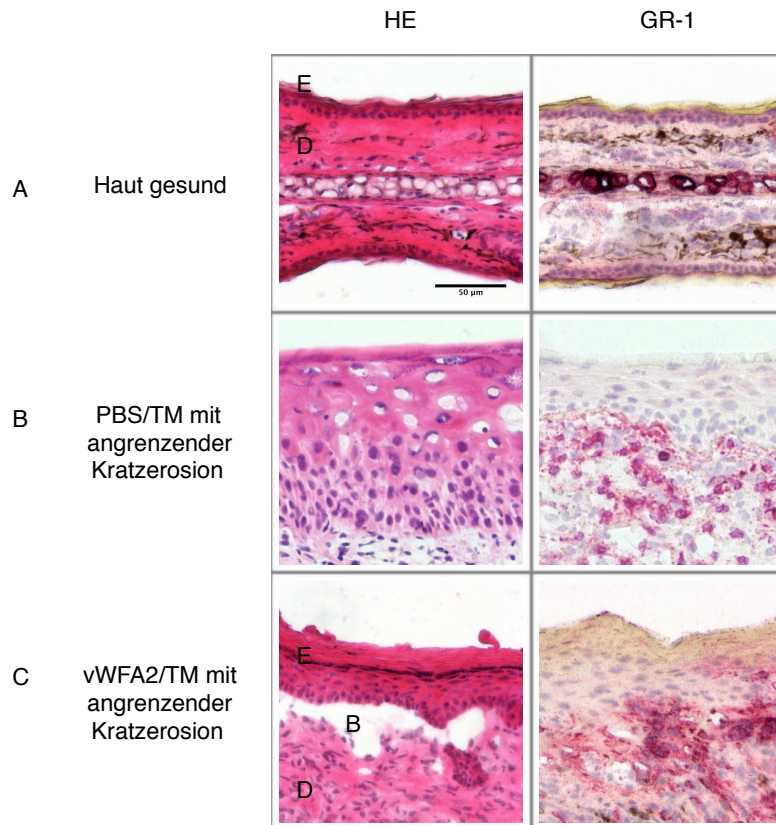


Abb 3.2 Entzündungsreaktion, hervorgerufen durch Zufügen von Kratzerosion

C57BL/6s Mäuse wurden in den linken und rechten Hinterlauf mit PBS in Titermax in der Kontrollgruppe und vWFA2 in Titermax in der Versuchsgruppe immunisiert. Eine Woche vor Beendigung des Experimentes wurde allen Mäusen eine Kratzerosion an den Ohren zugefügt. Durch diese Kratzerosion kommt es unabhängig von der Immunisierung zu einer Entzündungsreaktion, wie hier zu sehen ist.

Zu sehen ist jeweils eine Färbung mit HE und GR-1 eines Ohres einer Maus. In A) ist jeweils gesunde Haut zu sehen. Die Epidermis (E) liegt der Dermis (D) direkt an und beide Schichten sind nicht geschwollen. In der GR-1 Färbung sind keine neutrophilen Granulozyten zu sehen. In B) sieht man die Haut einer mit PBS/TM immunisierten Maus in der Nähe einer angrenzenden Kratzerosion. Durch das Zufügen dieser Kratzerosion kommt es sowohl zur Verbreiterung der Epidermis und Dermis als auch zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, zu sehen in der GR-1 Färbung. In C) sieht man die Haut einer mit vWFA2/TM immunisierten Haut in der Nähe der Kratzerosion. Hier kommt es neben der Verbreiterung der Schichten noch zusätzlich durch die Immunisierung zur Blasenbildung (B) zwischen Epidermis (E) und Dermis (D). Auch hier kommt es zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten. Maßstab $\cong 50\mu\text{m}$

3.1.2 Autoantikörperbildung und Aktivierung des Komplementsystems in der Versuchsgruppe: Die Mäuse sind an EBA erkrankt

Zum Nachweis, dass es tatsächlich zur Autoantikörperbildung gekommen ist und die Mäuse an EBA erkrankt waren, wurde eine direkte Immunfloreszenz gemacht. Es kam nur in der Versuchsgruppe zur Ablagerung von Autoantikörpern an der dermal-epidermalen Junctionszone. Bei naiven Mäusen und der Kontrollgruppe waren keinerlei Ablagerungen zu erkennen. Auch die Aktivierung des Komplementsystems fand nur bei der Versuchsgruppe statt (Abb.3.3). Damit konnte nachgewiesen werden, dass die Mäuse in der Versuchsgruppe an EBA erkrankt waren und sich Autoantikörper gebildet hatten.

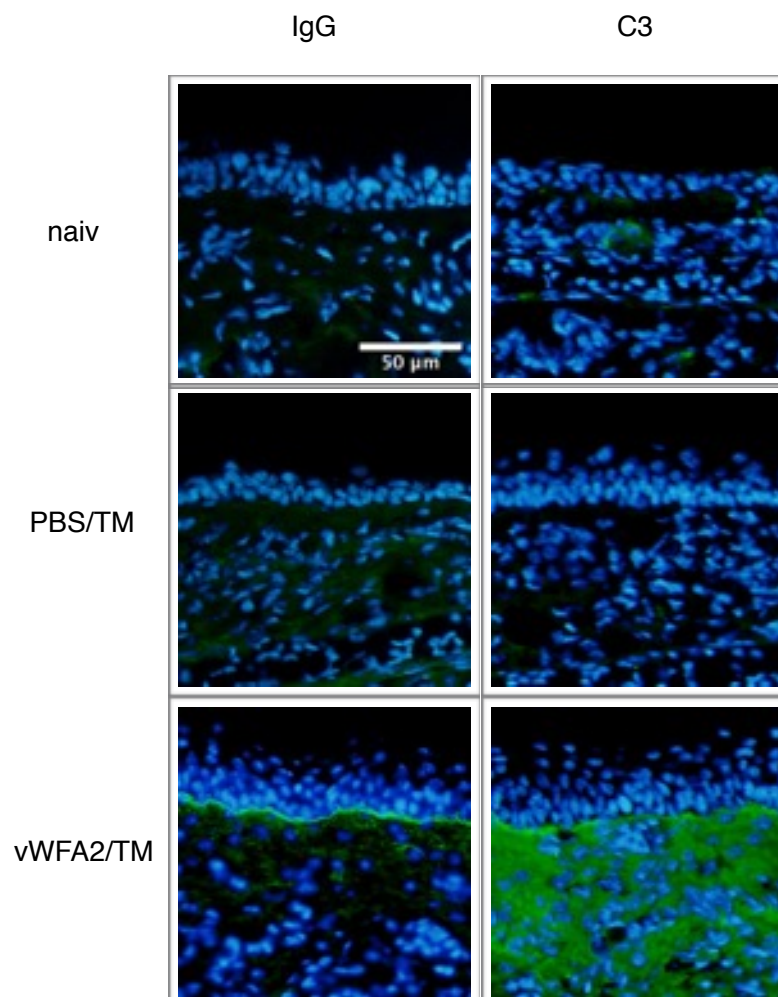


Abb. 3.3 Ablagerung von Autoantikörpern und Aktivierung des Komplementsystems in der Versuchsgruppe

C57BL/6s Mäuse wurden in den linken und rechten Hinterlauf mit PBS in Titermax in der Kontrollgruppe und vWFA2 in Titermax in der Versuchsgruppe immunisiert. Eine Woche vor Beendigung des Experimentes wurde allen Mäusen eine Kratzerosion an den Ohren zugefügt. Durch diese Kratzerosion kommt es unabhängig von der Immunisierung zu einer Entzündungsreaktion. Der Nachweis der Autoantikörperbildung wurde mittels direkter Immunfloreszenz durchgeführt. IgG lagert sich ausschließlich in der Versuchsgruppe an der DEJ ab. Außerdem wird das Komplementsystem aktiviert. Zellen in blau mit DAPI gefärbt, IgG in grün (links) und C3 in grün (rechts). Maßstab $\cong 50\mu\text{m}$

3.2 Bildung von Keimzentren

Für die Bildung dieser Autoantikörper war eine Keimzentrumsreaktion im Lymphknoten notwendig. Es ist im Lymphknoten durch die Immunisierung zur Aktivierung von B-Zellen gekommen, die dann ein Keimzentrum gebildet haben, indem sie proliferieren und zu autoantikörper-produzierenden Plasmazelle heranreifen konnten. Ohne die Hilfe von autoreaktiven Tfh-Zellen wäre diese Differenzierung allerdings nicht möglich gewesen (vgl. Kap. 1.1.1). Es müssten daher Tfh-Zellen in der Versuchsgruppe aktiver und vermehrt zu finden sein.

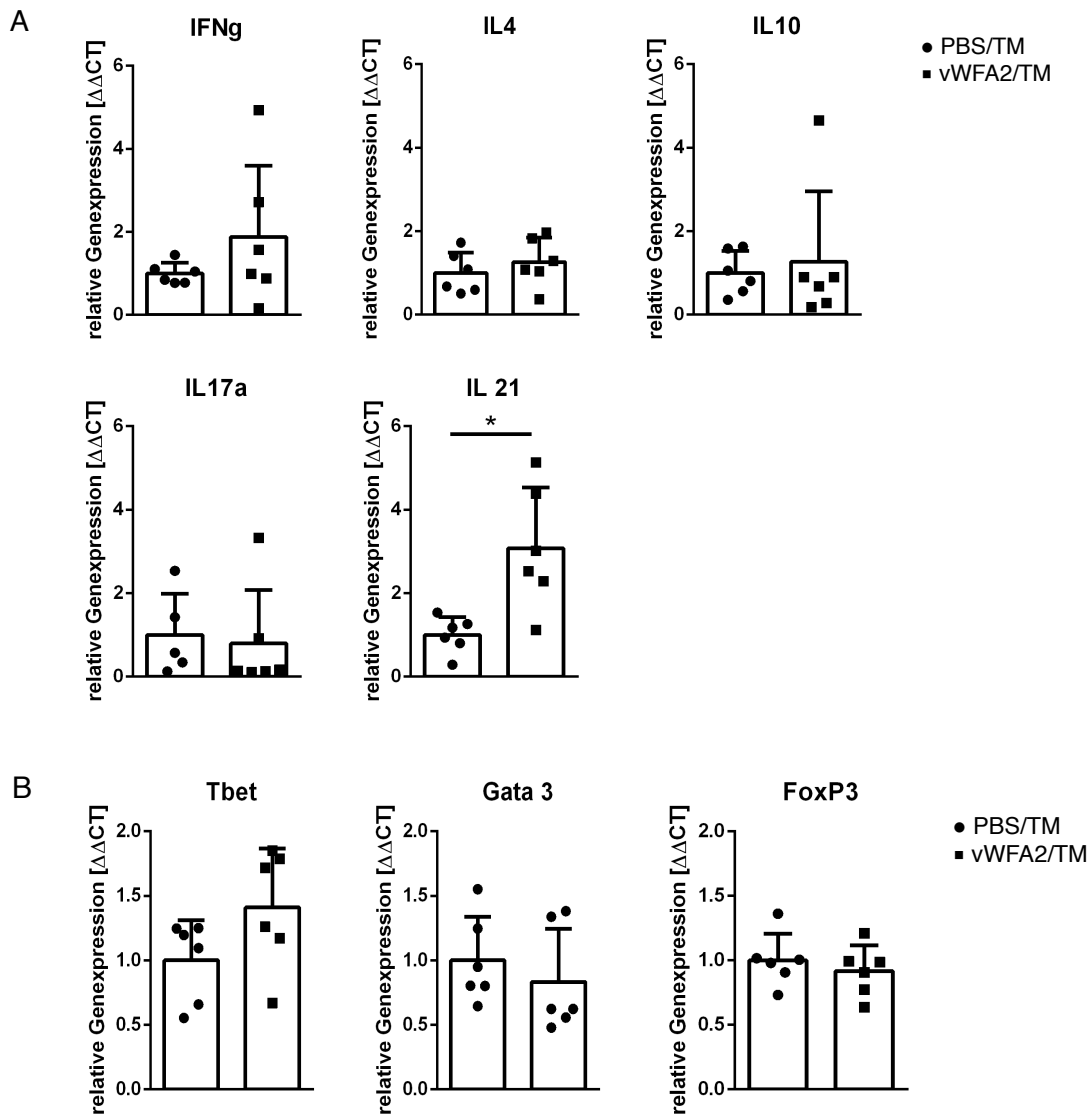
Um dieses zu quantifizieren und herauszufinden, ob es noch zu weiteren Unterschieden in den einzelnen T-Zellsubpopulationen zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe gekommen ist, wurden mittels q-PCR von Lymphknotenschnitten zum einen die jeweils verschiedenen Markerzytokine für die Subpopulationen bestimmt, und die entsprechenden Marker-Transkriptionsfaktoren, die bei der Differenzierung in eine Subpopulation gebildet werden (vgl. Kap. 1.2.4).

3.2.1 Tfh spezifisches Zytokin vermehrt bei Autoimmunität exprimiert

Zu dieser Quantifizierung wurde q-PCRs von ganzen Schnitten der Lymphknoten durchgeführt. Dabei kam heraus, dass nur ein signifikanter Unterschied bei den einzelnen Markerzytokinen und Marker-Transkriptionsfaktoren der einzelnen T-Zellsubpopulationen zu finden war (Abb. 3.4 A und B). Und dieses war Interleukin-21, das Zytokin, das besonders von Tfh Zellen exprimiert wird. Dieses war in der Versuchsgruppe signifikant erhöht (Abb. 3.4A.) Das unterstützt die Hypothese, dass durch das Autoantigen in der Versuchsgruppe vermehrt Tfh-Zellen ausreifen, um den B-Lymphozyten bei ihrer Ausreifung zu Plasmazellen helfen. Dieses wird noch

dadurch unterstützt, dass außerdem die aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase (AID), welches ein Enzym ist, das während des Klassenwechsels der B-Lymphozyten vermehrt exprimiert wird, in der Versuchsgruppe signifikant erhöht zu finden war (Abb. 3.4 C).

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung aufkommen, dass es nur in der Versuchsgruppe zur Bildung von Keimzentren gekommen ist.



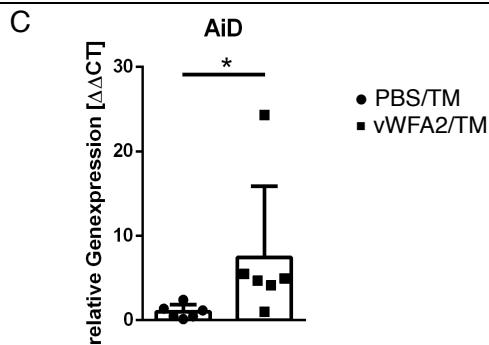


Abb.3.4 Quantitative Echtzeit PCR der Lymphknoten zeigen Unterschiede der Tfh- und B-Lymphozyten-Aktivität

C57BL/6s Mäuse wurden in den linken und rechten Hinterlauf mit PBS in Titermax in der Kontrollgruppe und vWFA2 in Titermax in der Versuchsgruppe immunisiert. Fünf Wochen nach Immunisierung kommt es zur Beendigung des Experimentes. Für die q-PCR werden 10 Kryoschnitte ganzer Lymphknoten verwendet. Hiermit werden die mRNA Mengen von spezifischen Markertranskriptionsfaktoren von einzelnen T-Zellsubpopulationen und teilweise die dazugehörigen Markertranskriptionsfaktoren bestimmt. Zur Quantifizierung werden sie mit einem Normalisierungsfaktor verrechnet und ins Verhältnis zur Kontrollgruppe gebracht, bei der der Mittelwert auf 1 gesetzt wurde. A) Zeigt die relative Genexpression verschiedener Markerzytokine und B) die teilweise entsprechenden Transkriptionsfaktoren. C) Zeigt die relative Genexpression der aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase im drainierenden Lymphknoten. N=6, n=6, Daten sind dargestellt als Mittelwert±SD, *p<0,05, Mann-Whitney-U-Test

3.2.2 Keimzentren sind in den Lymphknoten beider Gruppen auszumachen

Um diese Frage zu klären, wurden die poplitealen Lymphknoten mit Kryodissektion auf Objektträger gebracht und immunhistochemisch gefärbt. In beiden Gruppen sind Keimzentren zu erkennen (Abb. 3.5 A und B). Allerdings scheint die Dichte an Keimzentren in der Versuchsgruppe höher zu sein. Um trotzdem im Anschluss bei der Repertoireanalyse möglichst eine vergleichbare Ausgangssituation und damit möglichst auch vergleichbare Tfh-Zellzahlen zu erhalten, wurden mit Hilfe der Lasermikrodissektion in beiden Gruppen vergleichbare Volumen an Keimzentren ausgeschnitten. In der Kontrollgruppe $3,69 \times 10^7 \mu\text{m}^3 \pm 1,42$ und in der Versuchsgruppe $3,45 \times 10^7 \mu\text{m}^3 \pm 1,40$ (Abb. 3.5 C). Dabei wurde nach rechtem und linken poplitealen Lymphknoten unterschieden und diese getrennt voneinander ausgeschnitten.

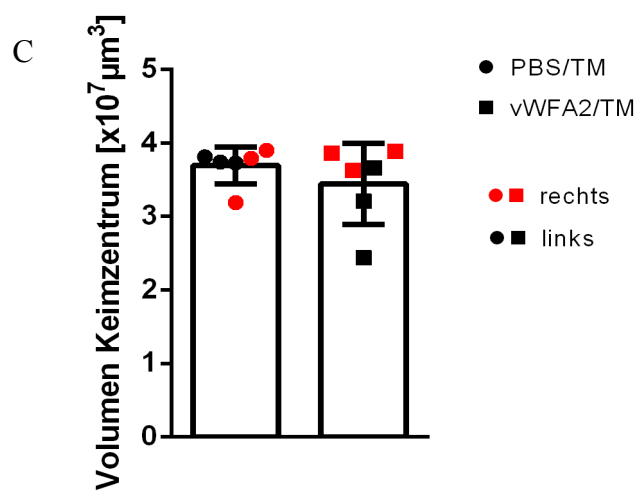
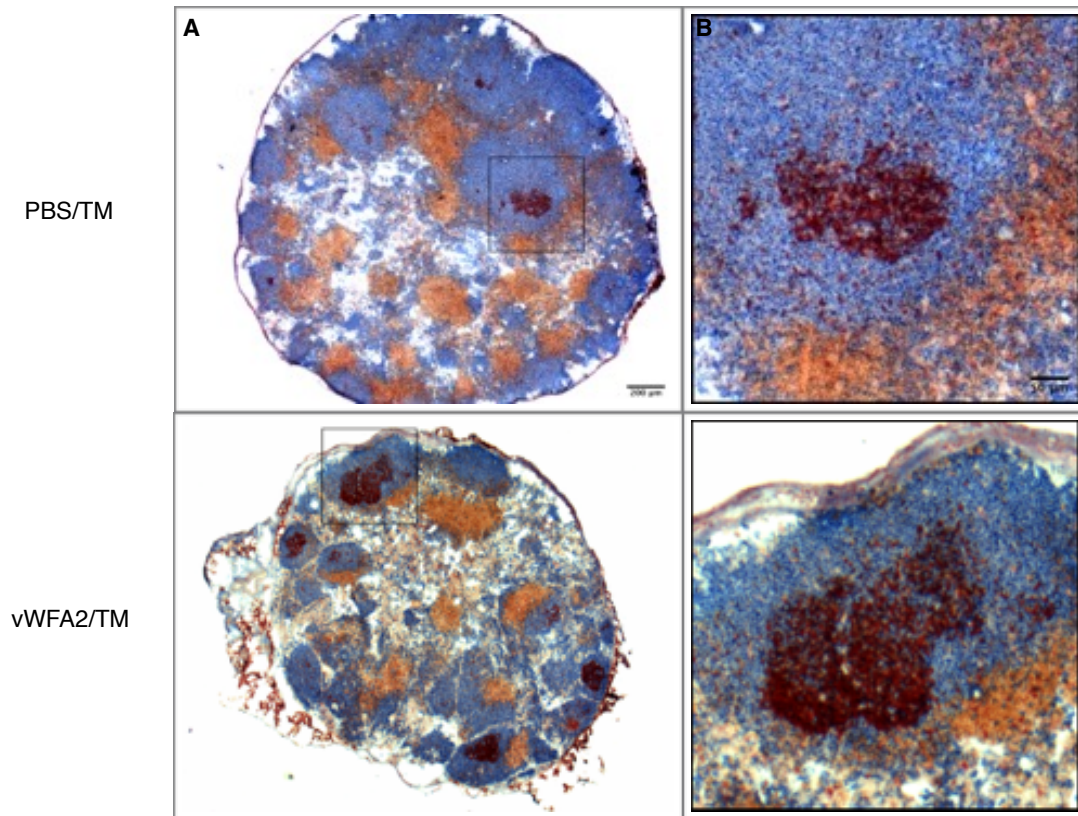


Abb. 3.5 Es kommt in beiden Gruppen zur Bildung von Keimzentren
 C57BL/6s Mäuse wurden in den linken und rechten Hinterlauf mit PBS in Titermax in der Kontrollgruppe und vWFA2 in Titermax in der Versuchsgruppe immunisiert. Fünf Wochen nach Immunisierung kommt es zur Beendigung des Experimentes und Kryoschnitte der drainierenden Lymphknoten werden angefertigt.

A) Kompletter poplitealer Lymphknoten der PBS/TM und vWFA2/TM immunisierten Mäuse mit einer immunhistochemischen Färbung der B-Lymphozyten (blau=B220), T-Lymphozyten (braun=bTCR β) und proliferierende Zellen (rot=Ki-67).

B) Vergrößerung eines Keimzentrums in der B-Zell-Zone des Lymphknotens. Maßstabsbalken A \triangleq 200 μ m, Maßstabsbalken B \triangleq 50 μ m

Aus diesen wurden zur weiteren Analyse mit Hilfe von Lasermikrodissektion die Keimzentren aus jeweils des rechten und linken poplitealen Lymphknotens einer Maus getrennt ausgeschnitten.

C) Dafür wurden vergleichsweise gleiche Volumina ausgeschnitten.

N=3, n=6 Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SD, Mann-Whitney-U-Test

3.3 Analyse des Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Repertoire bei EBA

Aus den mittels Lasermikrodissektion gewonnenen Ausschnitten der Keimzentren der jeweils linken und rechten poplitealen Lymphknoten wurden im Anschluss mit Hilfe von multiplex PCR und NGS die einzelnen T-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen der extrahierten Tfh-Zellen ermittelt.

3.3.1 Kein Unterschied in der Anzahl der Klonotypen beider Gruppen

Es konnten dabei für die Kontrollgruppe 2302 \pm 985 Klonotypen und für die Versuchsgruppe 1961 \pm 985 Klonotypen ermittelt werden, die somit in die spätere Analyse eingehen. Das heißt, es besteht kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der erhaltenden Klonotypen zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe (Abb. 3.6). Allerdings schwanken in beiden Gruppen die Zahlen der Klonotypen zwischen den Mäusen.

In diese Analyse gingen nur die Klonotypen mit ein, die in ihrer Häufigkeit über dem Median lagen, um Fehler möglichst gering zu halten. Dieses soll im Folgenden noch weiter verdeutlicht werden. Dafür wurde die Häufigkeitsverteilung aller Klonotypen näher betrachtet.

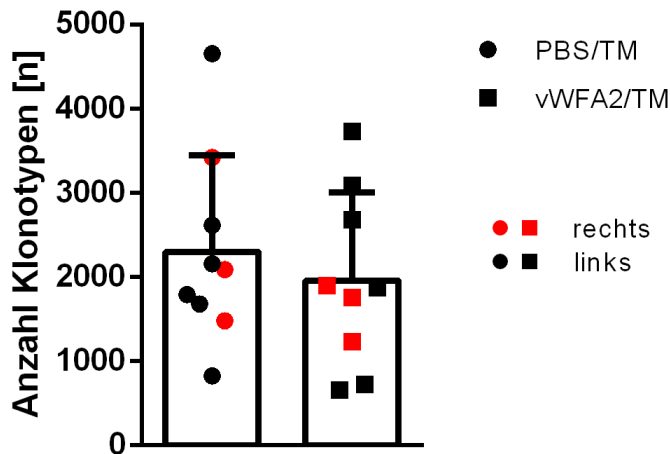


Abb. 3.6 Anzahl an Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen für beide Gruppen gleich

Fünf Wochen nach Immunisierung mit PBS/TM in der Kontrollgruppe oder vWFA2/TM in der Versuchsgruppe wurden die poplitealen Lymphknoten entnommen. Kryoschnitte wurden immunhistochemisch gefärbt, um die Keimzentren mit Hilfe der Lasermikrodissektion zu isolieren. Durch multiplex PCR und NGS wurden die Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen bestimmt. Die erhaltene Anzahl an Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen unterscheidet sich nicht zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe. Doch in beiden Gruppen zeigen sich starke Unterschiede in der Anzahl der Klonotypen N=6, n=9 Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SD, Mann-Whitney-U-Test

3.3.2 Häufigkeitsverteilung zeigt ungleiche Verteilung in allen Mäusen sowohl in Versuchs- als auch Kontrollgruppe

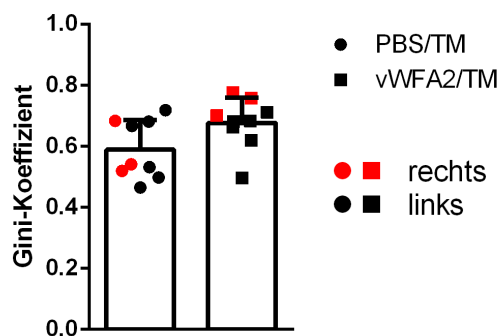
Bereits durchgeführte Repertoireanalysen von T-Zellen habe gezeigt, dass die Häufigkeitsverteilung der Klonotypen sehr ungleich ist. Es gab dabei immer einzelne Klonotypen, die sehr häufig vorkommen und zahlreiche Klonotypen, die nur sehr selten oder sogar nur einmal vorkommen.⁸² Dieses Verteilungsmuster zeigt sich auch hier für die Tfh-Zell-Klonotypen gewonnen aus den Keimzentren der poplitealen Lymphknoten jeweils einer Maus. Es zeigen sich auch hier einzelne Klonotypen, die sehr häufig vorkommen und viele, die nur selten vorkommen.

Um Verteilung der Frequenzen der Klonotypen zu quantifizieren, wurde der Gini-Koeffizient bestimmt. Dieser zeigt das Maß an Ungleichverteilung an und kann dabei zwischen 0 bei Gleichverteilung und 1 bei maximaler Ungleichverteilung liegen. Es konnte hiermit kein signifikanter Unterschied bei der Häufigkeitsverteilung zwischen beiden Gruppen festgestellt werden (Abb. 3.7 A).

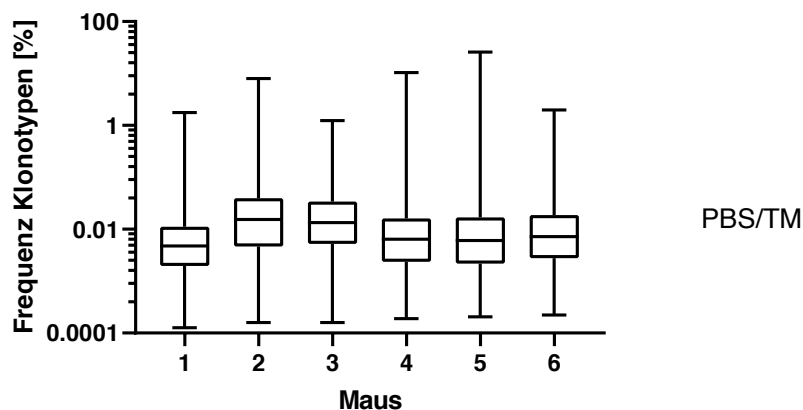
Dieses gibt auch der Vergleich der relativen Frequenzen der hochfrequenten Klonotypen aus den Keimzentren der einzelnen Mäuse miteinander her. Hierbei variiert die relative Frequenz der hochfrequenten Klonotypen sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe sehr stark (Abb. 3.7 B und C). Die relative Frequenz wurde dabei als Anzahl der einzelnen Klonotypen nach Normalisierung auf die Gesamtzahl aller Klonotypen einer Maus berechnet.

In diese Analyse wurden alle ermittelten Klonotypen miteingeschlossen. Um bei den weiterführenden spezifischeren Analysen aber eventuelle Fehler durch die multiplex PCR oder durch andere T-Lymphozytensubpopulationen möglichst gering zu halten, beziehen sich die weiteren Analysen der Klonotypen, nur auf die Klonotypen, die in ihrer Häufigkeit über dem Median liegen.

A



B



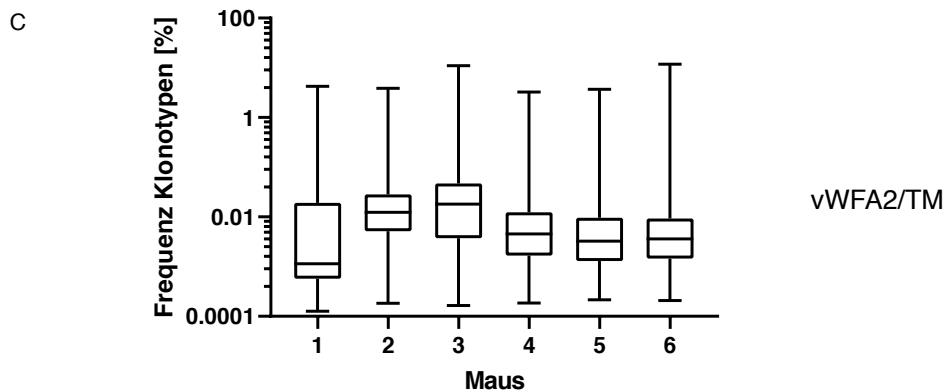


Abb 3.7 Median und maximal Werte der relativen Frequenzen der Tfh-Lymphozyten- β -Rezeptoren streuen in beiden Gruppen sehr, aber keinen signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen

Fünf Wochen nach Immunisierung mit PBS/TM oder vWFA2/TM wurden die poplitealen Lymphknoten entnommen. Kryoschnitte wurden immunhistochemisch gefärbt, um die Keimzentren mit Hilfe der Lasermikrodissektion zu isolieren. Mit Hilfe von multiplex PCR und NGS wurden die Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen bestimmt.

A) Quantifizierung der Verteilung der Frequenz mit Hilfe des Gini-Koeffizienten. Dabei wurde nach Klonotypen aus den Keimzentren des rechten und linken poplitealen Lymphknotens einer Maus unterschieden. B) Die relativen Frequenzen der einzelnen Klonotypen der jeweiligen Mäuse wurden für die Kontrollgruppe und C) für die Versuchsgruppe nach Normalisierung auf die Gesamtzahl der Maus aufgetragen. Dabei sind in den Box-Plots der minimale und der maximale Wert aufgetragen, sowie der Median. Zu A) N=6, n=9 Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SD, p=0,11, Mann-Whitney-U-Test

3.3.3 Akkumulation von Tfh-Klonotypen, die das V2-Segment benutzen unter Autoimmunität

Bei einer spezifischeren Repertoireanalyse können typische Merkmale des TZR angeschaut werden. Hierzu zählt zum Beispiel die Länge der CDR3-Regionen, also der Region im T-Zell-Rezeptor, die für die Antigenbindung zuständig ist. Es ist dabei z.B. interessant festzustellen, ob durch das Autoantigen die CDR3-Länge der T-Rezeptoren verändert ist. Außerdem können die Benutzung der V- und J-Segmente des TZR bestimmt werden. Hier könnten sich durch Verschiebungen in der Benutzung akkumulierende und damit eventuell autoreaktive Zellen zeigen.

In die im Folgenden durchgeführten Analyse gingen alle Tfh-Klonotypen, die oberhalb des Medians liegen und aus den Keimzentren aller Mäuse pro Gruppe stammen mit ein. Diese Analyse des Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Repertoires zeigt, dass es nicht zu signifikanten Änderungen der CDR3-Länge in der Versuchs- und Kontrollgruppe

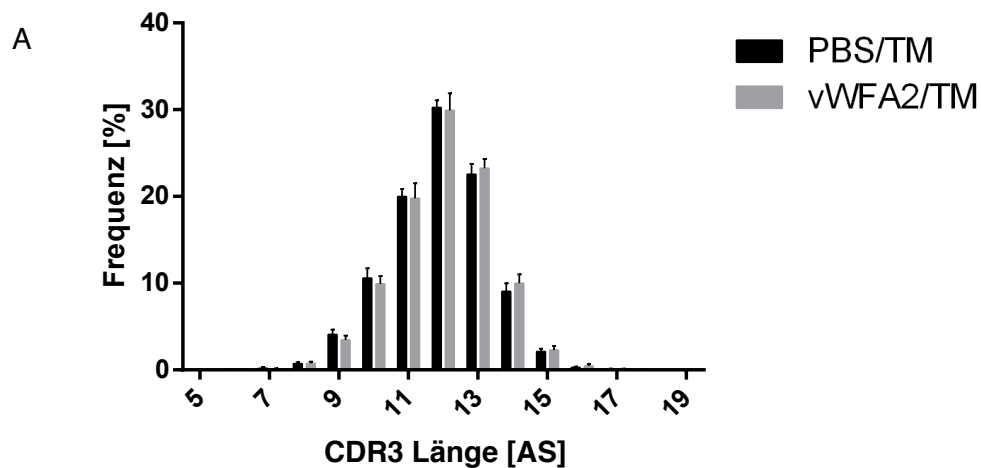
kommt. In beiden Gruppen reicht die CDR3-Länge von 6-18 Aminosäuren mit einem Häufigkeitsgipfel von 12 Aminosäuren (Abb 3.8 A).

Bei der Benutzung der V-Segmente wird deutlich, dass einige Segmente, wie V12-1, V13-3, V20, V23, V24, V29 und V30 kaum bis gar nicht genutzt werden, während V1 und V19 über 10% in beiden Gruppen zu finden sind.

Auffällig ist, dass das V2-Segment hochsignifikant häufiger von der Versuchsgruppe genutzt wird. In der Kontrollgruppe wird dagegen signifikant häufiger das V5-Segment benutzt (Abb 3.8 B). Es akkumulieren also nach Immunisierung besonders Tfh-Lymphozyten, die das V2-Segment benutzen. Es kommt hier also zu einer deutlichen Verschiebung der V-Segment Benutzung. Dieses führt zu der Hypothese, dass sich hierunter besonders die autoreaktiven Tfh-Zellen befinden, die durch die Immunisierung mit vWFA2 akkumulieren.

Die relative Frequenz der verschiedenen J-Segmente ist ebenfalls unterschiedlich. Beide Gruppen nutzen besonders J2-1, J2-5 und J2-7. J1-5 wird von beiden Gruppen hingegen kaum benutzt.

J2-7 wird von der Kontrollgruppe signifikant häufiger benutzt, allerdings konnte kein J-Segment ausfindig gemacht werden, dass in der Versuchsgruppe vermehrt zur Benutzung kommt (Abb. 3.8 C).



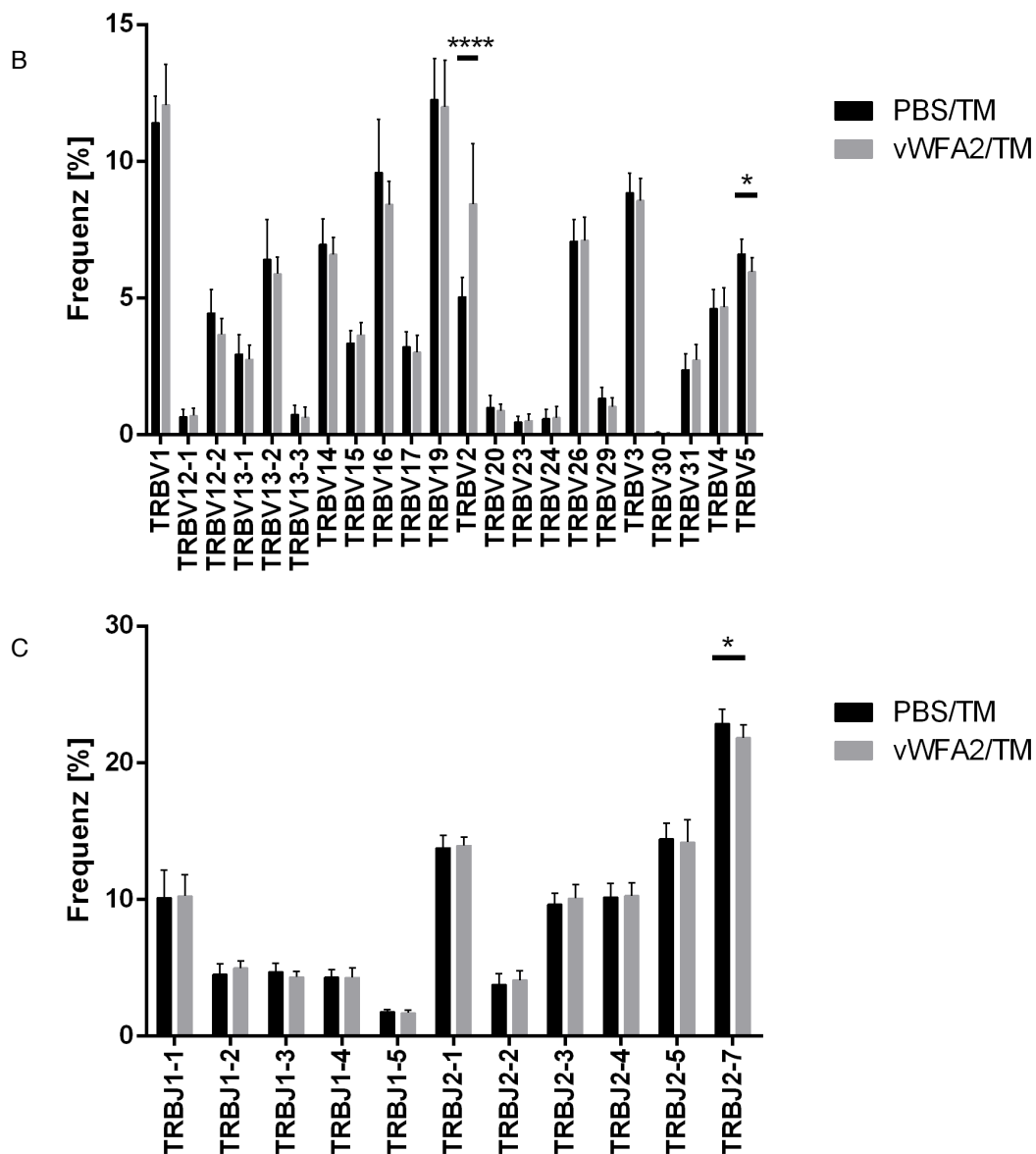


Abb 3.8 spezifische Analyse des Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Repertoires ergibt keine Änderung in der CDR3-Länge, erstaunliche Unterschiede in der Benutzung der V-Segmente und kleiner Unterschied in der Benutzung der J-Segmente

Fünf Wochen nach Immunisierung mit PBS/TM oder vWFA2/TM wurden die poplitealen Lymphknoten entnommen. Kryoschnitte wurden immunhistochemisch gefärbt, um die Keimzentren mit Hilfe der Lasermikrodissektion zu isolieren. Mit Hilfe von multiplex PCR und NGS wurden die Tfh-Lymphozytenrezeptor-b-Klonotypen bestimmt. A) Darstellung der Aminosäuren-Länge der CDR3-Region der Klonotypen mit entsprechender relativer Frequenz B) Darstellung der relativen Frequenz der Klonotypen in der Benutzung der verschiedenen V-Segmente und C) J-Segmente der beiden Gruppen. N=6, n=9, Daten dargestellt mit Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$, Mann-Whitney-U-Test, Abbildung B und C, vgl. Niebuhr *et al.* (2021).⁶³

3.3.4 Diversität nimmt unter Autoimmunität ab

Nachdem schon deutliche Verschiebungen in der V-Segment Benutzung der Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen aus den Keimzentren aller Mäuse gefunden wurden. War ein nächster interessanter Punkt in der Analyse herauszufinden, ob unter Autoimmunität auch die Diversität der Klonotypen zwischen den Mäusen abnimmt, also genauer gesagt, ob vermehrt öffentliche Klonotypen, also identische Klonotypen, die in mehreren Mäusen vorkommen, in der Versuchsgruppe gefunden werden können.

Um dieses zu untersuchen, wurden zunächst die öffentlichen Klonotypen einzelner Mäuse miteinander verglichen. Dabei fällt auf, dass es in der absoluten Anzahl mehr öffentliche Klonotypen in der Versuchsgruppe als in der Kontrollgruppe gibt. Dieses ist hier einmal beispielhaft für drei Mäuse in einem Venn-Diagramm gezeigt. Es ist zu sehen, dass fast doppelt so viele öffentliche Klonotypen sowohl nur zwischen zwei Mäusen, als auch zwischen allen dreien in der Versuchsgruppe zu finden sind (Abb. 3.9 A).

Um dieses nun zu quantifizieren, wurden zwei Indices benutzt. Zum einen der Jaccard-Index, welcher auf die verschiedenen Probengrößen korrigiert. Dieses ist sinnvoll, da die Anzahl der Klonotypen in den einzelnen Mäusen beider Gruppen stark variiert (vgl. Abb. 3.6). Und zum anderen der Morisita-Horn-Index, welcher die hochfrequenten Klonotypen stärker wichtet. Dieses ist auf Grund der starken Ungleichverteilung der hochfrequenten Klonotypen sinnvoll (vgl. Kap. 3.3.2). Der Jaccard-Index zeigt dabei Werte in der Kontrollgruppe von $0,0037 \pm 0,0010$ und in der Versuchsgruppe von $0,0049 \pm 0,0015$ (Abb 3.9 B). Das entspricht einem signifikanten Unterschied.

Der Morisita-Horn-Index nimmt in der Kontrollgruppe die Werte von $0,0023 \pm 0,0036$ und in der Versuchsgruppe von $0,0408 \pm 0,0875$ an und zeigt somit einen starken signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (Abb 3.9 C).

Somit stützt das die Hypothese, dass das Repertoire der Tfh-Lymphozyten bei der Immunisierung durch den vWFA2/TM ähnlicher wird und es zur Akkumulation von identischen Klonotypen kommt.

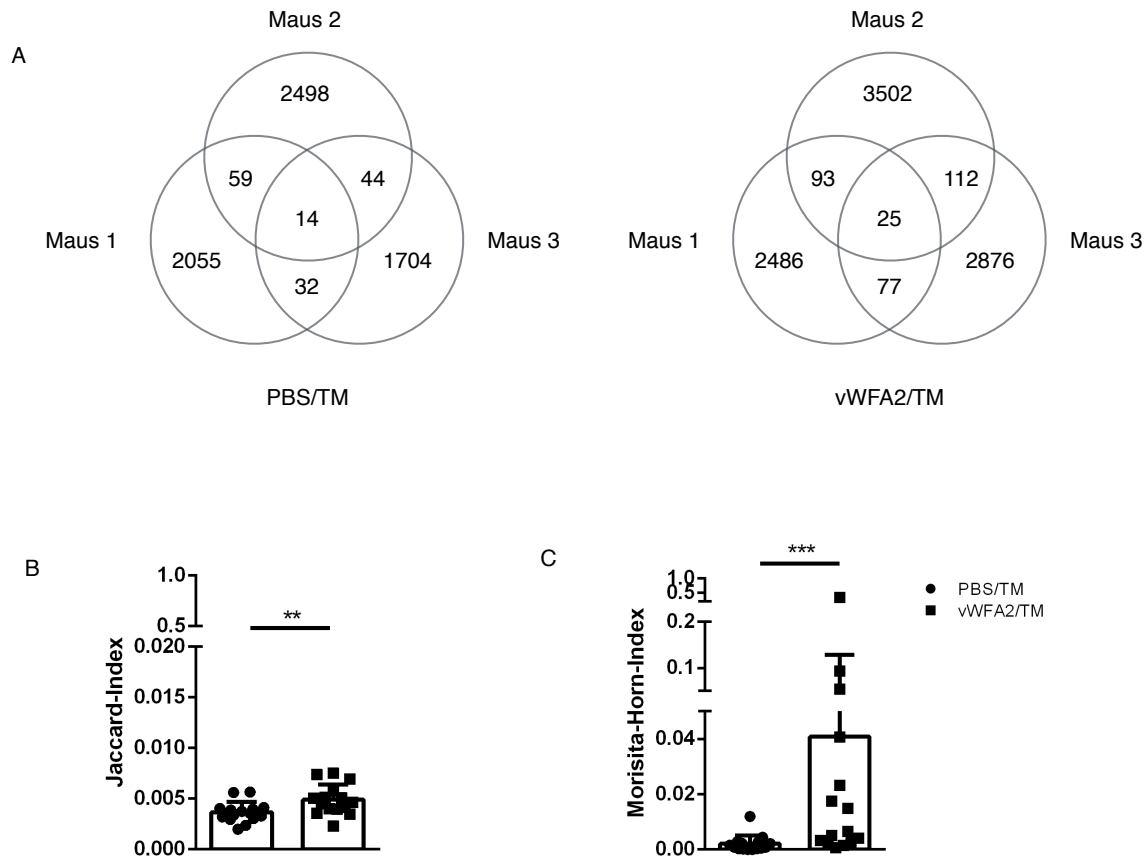


Abb 3.9 Größere Übereinstimmung und Akkumulation der Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen unter Autoimmunbedingungen
 Fünf Wochen nach Immunisierung mit PBS/TM oder vWFA2/TM wurden die poplitealen Lymphknoten entnommen. Kryoschnitte wurden immunhistochemisch gefärbt, um die Keimzentren mit Hilfe der Lasermikrodissektion zu isolieren. Mit Hilfe von multiplex PCR und NGS wurden die Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen bestimmt. A) Venndiagramme der Klonotypen der Kontroll- und der Versuchsgruppe exemplarisch mit 3 Mäusen. B) Jaccard-Index und C) Morisita-Horn-Index. N=6, n=15, Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SD, **p<0,01, ***p<0,001, Mann-Whitney-U-Test

3.3.5 Öffentliche Klonotypen benutzen vermehrt das V2-Gen-Segment bei EBA

Es konnte also bisher gezeigt werden, dass es in der Versuchsgruppe zur Akkumulation von Tfh-Zellen kommt, die in ihrem Rezeptor das V2-Segment benutzen. Und es konnte gezeigt werden, dass es in der Versuchsgruppe vermehrt öffentliche Tfh-Zellen gibt, die in mehreren Mäusen pro Gruppe zu finden sind. Daraus ergibt sich nun die Frage, ob diese öffentlichen Tfh-Zellen besonders häufig das V2-Segment in der Versuchsgruppe benutzen.

Dazu wurden die verschiedenen V-Gen-Segmente der Klonotypen ermittelt, die in drei Mäusen zu finden sind. Bei der Analyse (Abb. 3.10) wird sofort deutlich, dass bei den öffentlichen Klonotypen in der Versuchsgruppe über 40% das V2-Gen-Segment in ihrem Rezeptor tragen. Die Kontrollgruppe benutzt dagegen die verschiedenen V-Gen-Segmente im Verhältnis eher ausgeglichen und das V2-Segment fehlt völlig. Dieses stützt weiter die Hypothese, dass es besonders diese öffentlichen Tfh-Zellen mit V2-Segment sind, die nach Immunisierung mit vWFA2 akkumulieren und somit autoreaktiv sind.

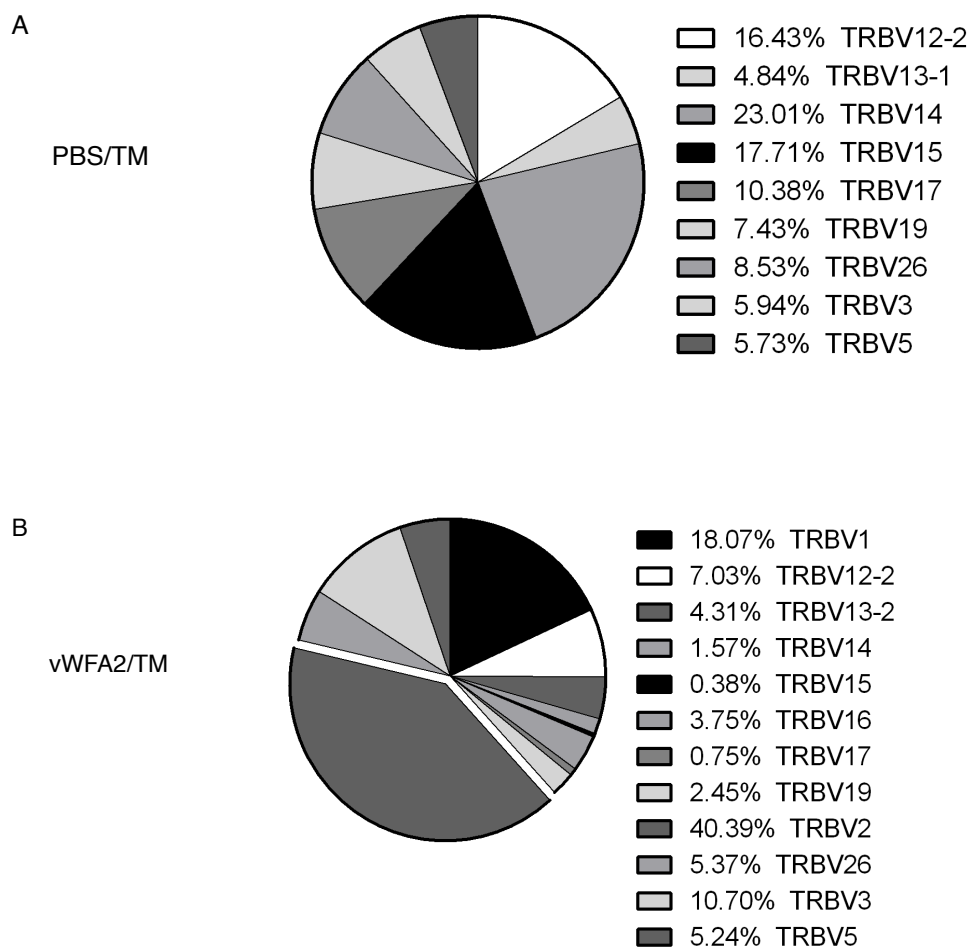


Abb. 3.10 Übereinstimmende Klonotypen benutzten hauptsächlich das V2-Gen-Segment bei EBA

C57BL/6s Mäuse wurden in den linken und rechten Hinterlauf mit vWFA2 in Titermax als Versuchsgruppe und PBS in Titermax als Kontrollgruppe immunisiert. Kryoschnitte wurden immunhistochemisch gefärbt, um die Keimzentren mit Hilfe der Lasermikrodissektion zu isolieren. Mit Hilfe von multiplex PCR und NGS wurden die Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen bestimmt. Es wurden Klonotypen ausgewählt, die in drei Mäusen vorhanden waren, und ihre entsprechenden V-Gen-Segmente bestimmt. Angegeben ist jeweils das Verhältnis der Klonotypen, die ein bestimmtes V-Gen-Segment nutzen, bezogen auf alle übereinstimmenden Klonotypen einer Immunisierungsgruppe. Bei A) wurden die Tiere mit PBS/TM und bei B) mit vWFA2/TM immunisiert. Herausgehoben ist das V2-Gen-Segment. N=3

3.3.6 Im Seitenvergleich akkumulieren die gleichen Klonotypen bei Autoimmunität

Bisher wurden die Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen immer zwischen mehreren Mäusen verglichen, um zu gucken, ob hier akkumulierende Tfh-Zellen ausgemacht werden können, die damit ein Hinweis auf autoreaktive Zellen sein können.

Es war aber außerdem noch spannend zu erfahren, wie es sich mit den Tfh-Klonotypen in einer Maus verhält. Hier ließe sich jetzt eine ähnliche Frage formulieren. Wenn die Klonotypen zwischen den Mäusen öffentlicher werden, wie sieht es dann mit den Tfh-Klonotypen der Keimzentren in einer Maus aus.

Akkumulieren auch hier identische Klonotypen?

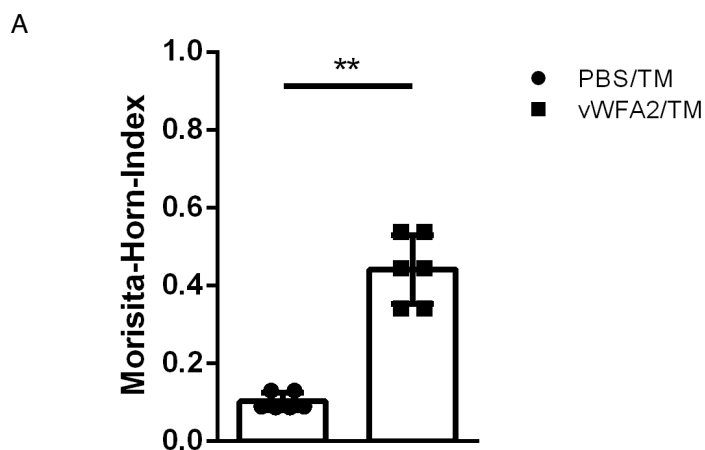
Für diese Analyse, wurden die Keimzentren der poplitealen Lymphknoten vom rechten und vom linken Hinterlauf entnommen. Es wurden getrennt voneinander die Tfh-Klonotypen bestimmt. Vergleicht man die gewonnenen Klonotypen der beiden Seiten aus einer Maus miteinander, fällt auf, dass auch hier durch die Immunisierung mit vWFA2 mehr identische Klonotypen zu finden sind. Dieses wurde zunächst wieder mit dem Morisita-Horn-Index quantifiziert (Abb. 3.11 A). Diese Werte liegen in der Kontrollgruppe bei $0,10 \pm 0,02$ und in der Versuchsgruppe bei $0,44 \pm 0,09$, und zeigen somit einen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe. Um dieses noch weiter zu spezifizieren, wurden jeweils von einer Maus je Gruppe, die 20 hochfrequenten Klonotypen der Keimzentren der poplitealen Lymphknoten der rechten Seite nach ihrer relativen Frequenz aufgetragen und mit denen der linken Seite der gleichen Maus verglichen. Dabei kommt es in der Kontrollgruppe zu

wenigen identischen Klonotypen. Führt man das gleiche allerdings bei einer Maus der Versuchsgruppe durch, ist die Übereinstimmung enorm.

Dieses ist hier beispielhaft bei einer Maus je Gruppe gezeigt. Es kommt beim Vergleich der 20 hochfrequenten Klonotypen zu sieben identischen Klonotypen in der Kontrollgruppe. Bei einer Maus der Versuchsgruppe sind es hingegen 15 gleiche Klonotypen (Abb. 3.11 B).

Und noch etwas fällt bei dieser genauen Betrachtung der 20 hochfrequenten Klonotypen im Seitenvergleich auf. Es sind nicht nur deutlich mehr identische Klonotypen zu finden, sondern auch die relativen Frequenzen, mit denen die übereinstimmenden Klonotypen vorkommen, sind sich ähnlicher. Dieses ist daran zu erkennen, dass die schwarzen Punkte in Abb. 3.11 B bei der Versuchsgruppe auf Höhe der entsprechenden roten Punkte zu finden sind.

Dieses unterstützt zum einen die Hypothese, dass nach Immunisierung mit vWFA2 identische Klonotypen in beiden Seiten akkumulieren. Zum anderen könnte die deutliche Übereinstimmung der relativen Frequenzen aber auch dafür sprechen, dass es vielleicht einen Austausch zwischen beiden Seiten gibt.



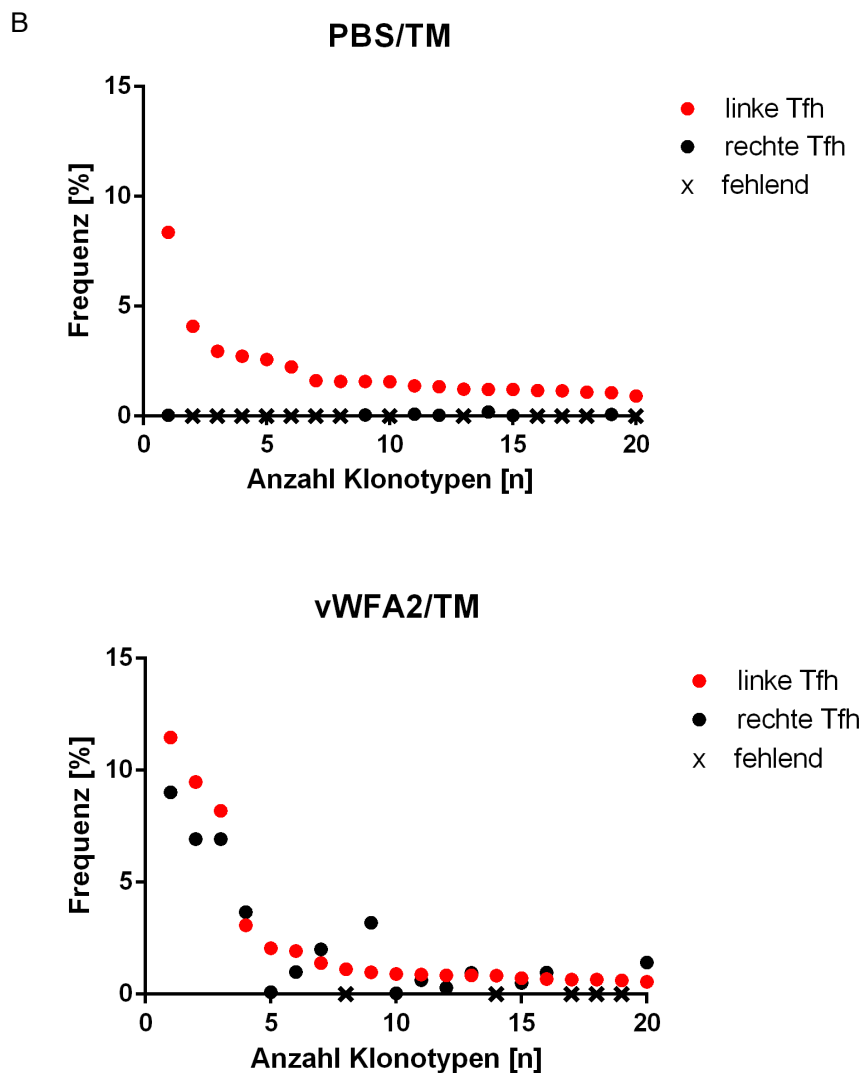


Abb. 3.11 Starke Übereinstimmung und Akkumulation der Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen des rechten und linken poplitealen Lymphknotens bei Autoimmunität

Fünf Wochen nach Immunisierung mit PBS/TM oder vWFA2/TM wurden die poplitealen Lymphknoten entnommen. Kryoschnitte wurden immunhistochemisch gefärbt, um die Keimzentren mit Hilfe der Lasermikrodissektion zu isolieren. Mit Hilfe von multiplex PCR und NGS wurden die Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen bestimmt. A) Morisita-Horn-Index B) Die 20 hochfrequenten Klonotypen des linken poplitealen Lymphknotens der beiden Gruppen (oben PBS/TM, unten vWFA2/TM) wurden in ihrer relativen Frequenz aufgetragen (rot) und mit der rechten Seite verglichen (schwarz). Sind die gleichen Klonotypen auch in dem rechten poplitealen Lymphknoten zu finden, erhalten sie einen Punkt, gibt es sie nicht, ist dieses mit einem Kreuz gekennzeichnet. N=3, n=6, Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SD, **p<0,01, Mann-Whitney-U-Test, Abbildung A, vgl. Niebuhr *et al.* (2021).⁶³

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es lassen sich also folgende Ergebnisse zusammenfassen. Es lässt sich bei der Analyse des Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Repertoire nach einer Immunisierung mit vWFA2 im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe eine Akkumulation von Klonotypen feststellen, die signifikant häufiger das V2-Gensegment benutzen. Außerdem kann eine Abnahme der Diversität gezeigt werden. Diese äußert sich darin, dass vermehrt öffentliche Klonotypen zwischen den Mäusen nach Immunisierung zu finden sind. Interessanterweise wird von diesen öffentlichen Klonotypen bei der Versuchsgruppe auch deutlich häufig das V2-Gensegment benutzt.

Außerdem konnte bei der Analyse der Tfh-Zellen aus dem Keimzentren der kontralateralen poplitealen Lymphknoten einer Maus vermehrt identische Klonotypen im Vergleich zu der Kontrollgruppe ausgemacht werden.

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind, dass es in dem aktiven Modell der EBA mit Immunisierung mit dem *von-Willebrand-factor-A-like-domaine-2*

- (I) zu Veränderungen im Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Repertoire gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe kommt, da eine Akkumulation von Klonotypen ausgemacht werden konnte, die besonders das V2-Gen-Segment benutzen,
- (II) die Diversität des Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Repertoires gegenüber der Kontrollgruppe abnimmt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass das Repertoire unter Autoimmunität ähnlicher wird, indem vermehrt öffentliche Klonotypen zu finden sind.

Außerdem zeigte sich eine starke Übereinstimmung der Klonotypen im Seitenvergleich der Lymphknoten innerhalb einer immunisierten Maus. Dabei wurden identische Klonotypen in beiden Seiten aufgefunden, die zusätzlich eine ähnliche relative Frequenz der einzelnen Klonotypen aufwiesen.

Diese Arbeit zeigt damit, dass trotz der bisher angenommenen enormen Diversität des T-Zellrezeptorrepertoires spezifische Tfh Zellen nach Immunisierung mit vWFA2 ausgemacht werden können, die akkumulieren und somit wahrscheinlich autoreaktiv sind.

Im Folgenden soll näher diskutiert werden, was diese Ergebnisse für das Verständnis von Tfh-Zellen und den Reaktionen im Keimzentrum bedeuten, und wie man daraus Erkenntnisse für die weitere Forschung ziehen kann.

4.1 Veränderungen im Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Repertoire bei Immunisierung mit vWFA2

Tfh-Zellen erscheinen besonders für eine Repertoireanalyse unter Autoimmunität geeignet. Sie sind eine Subpopulation der CD4⁺-T-Helferzellen. Sie sind im Keimzentrum der sekundär lymphatischen Organe wie dem Lymphknoten zu finden und leisten dort Hilfe bei der Entwicklung von der GC-B-Zelle hin zur hochaffinen antikörperpräsentierenden Plasmazelle.⁶ Diese Tfh-Zellen sind Ausgangspunkt bei

Autoimmunerkrankungen hin zur Produktion von Autoantikörpern. Es ist bereits bekannt, dass ihre Differenzierung stark von der TZR-Signalstärke abhängt und daher angenommen wird, dass diese Zellen antigenspezifisch sind.¹¹

Daher erscheinen speziell diese Zellen dafür geeignet, eine Repertoireanalyse durchzuführen und die Frage zu klären, ob es nach Immunisierung mit dem vWFA2 zu Verschiebungen im Repertoire kommt, und ob antigenspezifische Zellen ausgemacht werden können.

4.1.1 Voraussetzungen für die Analyse des Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Repertoires

Um bei einer Repertoireanalyse antigenspezifische Zellen ausmachen zu können, war es wichtig, dass die Mäuse sicher an EBA erkrankt waren. Es gibt bereits zwei etablierte Methoden, um aktiv in der Maus diese Erkrankung auszulösen. Bei der ersten Methode wird die Immunisierung mit mCOL7c ausgelöst, welches aus Peptidfragmenten aus der NC1-Domäne des Kollagen VII besteht und noch mit einem xenogenen GST-Fusionsprotein verbunden ist.⁵⁹ Bei der zweiten Methode wird mit einem rekombinant hergestellten murinen vWFA2 immunisiert. Dieses Peptid liegt ohne jegliches Fusionsprotein vor.⁶⁰ Da für die Analyse eine möglichst spezifische Immunreaktion gewollt ist, wurde sich für die zweite Methode entschieden, um mögliche nicht-autoreaktive Reaktionen möglichst gering zu halten.

Durch den Ausbruch der Erkrankung kam es im Verlauf des Experimentes bei den Mäusen zu Blasenbildung besonders an der Ohrhaut. Durch diese Wundenbildung in der Haut kann es zum Eindringen von Krankheitserregern kommen, die eine generelle Entzündungsreaktion hervorrufen. Auch wenn zu der durchgeführten Analyse die Tfh-Zellen aus den Keimzentren der poplitealen Lymphknoten gewonnen wurden, sollten zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Kontroll- und der Versuchsgruppe möglichst gleiche Bedingungen vorliegen. Daher wurde bei beiden Gruppen eine von Größe und Wundtiefe vergleichbare Kratzerosion an der Innenseite des Ohres zugefügt. So kam es in beiden Gruppen zu einer Entzündungsreaktion. Um nachzuweisen, dass die Mäuse tatsächlich an EBA erkrankt waren, wurden die Autoantikörper mit Hilfe einer direkten Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Somit konnte sicher nachgewiesen werden, dass eine Autoimmunreaktion des Körpers mit

Bindung von Autoantikörpern spezifisch gegen Kollagen VII stattgefunden hatte und die Mäuse an EBA erkrankt waren.

Auch in der Diagnostik beim Menschen wird diese Methode angewandt. Dazu werden periläsionale Hautbiopsien entnommen und mittels direkter Immunfluoreszenz lineare IgG- oder C3-Ablagerungen nachgewiesen. Es kann auch ein serologischer Nachweis durchgeführt werden, doch nur bei ca. 50% lassen sich zirkulierende Antikörper nachweisen. Dieses kann dann aber bei positivem Befund als Nachweis für die Schwere der Erkrankung dienen.⁸³

Es wäre hier also wünschenswert, wenn ein serologischer Nachweis mit hoher Spezifität und Sensitivität entwickelt werden würde. So müssten den Patienten nicht zwangsläufig Hautbiopsien entnommen werden. Auch hier könnten Repertoireanalysen dazu beitragen, so ein Diagnostik-Tool zu entwickeln. Es konnten bereits Ergebnisse gezeigt werden, die darauf hindeuten, dass der TZR bei SLE und RA als ein guter serologischer Biomarker dienen könnte.⁴⁴

Ließen sich bei EBA also sicher autoreaktive Zellen ausmachen und ließen sich diese dann auch im Blut feststellen, könnte man diese auch zu diagnostischen Zwecken oder eventuell zur Verlaufskontrolle oder zum Therapieerfolg identifizieren.

4.1.2 Bildung von Keimzentren in der Kontroll- sowie in der Versuchsgruppe

Da die Bildung und Bindung von Autoantikörpern nachgewiesen wurde, musste es zur Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen gekommen sein. Diese Differenzierung beginnt dabei in den Keimzentren der Lymphknoten. Dabei scheint als ein wichtiger Mechanismus für die Differenzierung in diese GC-B-Zelle die kostimulatorischen Signale von Tfh-Zellen zu sein (vgl 1.1.1). Um zunächst einen Überblick über die Reaktionen im Lymphknoten, bezogen auf die verschiedenen Subpopulationen der T-Zellen zu erhalten, wurden die Markerzytokine mittels qPCR bestimmt.

Bei der Quantifizierung der Markerzytokine der einzelnen Subpopulationen der T-Zellen in den Lymphknoten, zeigte sich dann auch eine signifikante Zunahme des IL-21 in den Lymphknoten der Versuchsgruppe. IL-21 gilt als ein von Tfh-Zellen produziertes Signalmolekül. Es soll Einfluss auf die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen haben.¹¹ Alle anderen untersuchten Markerzytokine und entsprechende Transkriptionsfaktoren zeigten keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Dieses

Ergebnis lässt sich damit erklären, dass durch das Autoantigen vermehrt Tfh-Zellen ausreifen und aktiviert werden, um den B-Zellen Hilfe zu leisten. Auch ist die aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase (AiD), welches ein Enzym ist, das während des Klassenwechsels der B-Lymphozyten vermehrt exprimiert wird, in der Versuchsgruppe signifikant erhöht. Der Unterschied zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe scheint also besonders in der Aktivierung der Tfh-Zellen und des Klassenwechsels der B-Zellen zu liegen. Eine Erklärung dafür ist die Produktion der Autoantikörper, bei der durch die Hilfe der Tfh-Zelle die B-Zelle zur Antikörperproduzierenden Plasmazelle ausreift. Da dieses in den Keimzentren geschieht, könnte das auch heißen, dass es eventuell nur in der Versuchsgruppe zur Bildung von Keimzentren gekommen ist.

Es zeigte sich allerdings in den immunhistologischen Färbungen der Lymphknoten, dass es auch in der Versuchsgruppe zur Bildung von Keimzentren gekommen ist (vgl. 3.2.2).

Eine Erklärung dafür, dass es auch in der Kontrollgruppe zur Ausbildung von Keimzentren gekommen ist, wäre durch die lokale Entzündungsreaktion gegeben, die durch die Injektion von TiterMax (TM) ausgelöst wird. TM ist ein Wasser-in-Öl Adjuvants, welches neben anderen Komponenten auch Squalen enthält, aber keine Peptide. Somit kann TM alleine keine T-Zellen aktivieren. Die Aktivierung von T-Zellen lässt sich aber darüber erklären, dass durch die Injektion des Adjuvants eine lokale Entzündungsreaktion mit Nekrosen entsteht und es zur Freisetzung von endogenen Peptid-Epitopen kommt, die dann anschließend den T-Zellen präsentiert werden und die Keimzentrumsbildung auslösen.^{63,84} Und in der Tat konnte man nach der Immunisierung in beiden Gruppen deutlichen Entzündungsreaktionen der Hinterläufe beobachten.

Es scheint aber, dass die Dichte mit der die Keimzentren im Lymphknoten auftreten, geringer ist und die Keimzentren scheinen kleiner (vgl. 3.2.2). Somit könnten die in Kap.3.2.1 beobachtete Zunahme an IL-21 und AiD über die erhöhte Dichte an Keimzentren zustande gekommen sein. Für die zur Quantifizierung genutzte qPCR wurden gleiche Mengen an Schnitten von Lymphknoten eingesetzt. Und somit wäre es möglich, dass auch in den Schnitten der Versuchsgruppe die Dichte an Keimzentren höher war und die quantitativ erhöhte Expression von IL-21 und AiD in der Versuchsgruppe darüber zu erklären wäre.

Dass es überhaupt zu diesem Unterschied in der Dichte und Größe der Keimzentren kommt, könnte daran liegen, dass es durch die beschriebene Entzündungsreaktion, zur Freisetzung von endogenen Peptid-Epitopen in niedriger Konzentration kommt. Die Immunisierung mit vWFA2 musste aber, um zur Autoimmunität zu führen, in vergleichsweise hohen Dosen injiziert werden. Es wurde bereits gezeigt, dass die Entstehung von Keimzentren und die Aktivierung von Tfh-Zellen auch auf einem Wettbewerb um Antigenkontakt beruht.⁸⁵ Daher könnte die erhöhte Dichte an Keimzentren in der Versuchsgruppe, darüber zu erklären sein, dass in der Versuchsgruppe das Angebot an Antigen durch den entstandenen Konzentrationsunterschied größer ist.

4.1.3 Gleiche Anzahl von Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen in den Keimzentren der drainierenden Lymphknoten gefunden

Um durch diesen Unterschied in der Dichte der Keimzentren die Analyse der Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen nicht zu verzerren, wurden bei der Mikrodissektion gleiche Volumen der Keimzentren ausgeschnitten. Für eine sinnvolle Analyse des Repertoires ist eine gleiche Menge an Klonotypen wichtig, da es sonst auf Grund der verschiedenen Verhältnismäßigkeiten und der großen Vielfalt zu Unterschieden in der Diversität kommen könnte.

Die gleiche Anzahl an Zellen ist dabei entscheidend für die Richtigkeit der Repertoireanalysen, da es nur möglich ist, Vergleiche anzustellen, wenn die T-Zellen unabhängig, zufällig und mit der gleichen Nachweiswahrscheinlichkeit entnommen wurden.²⁵ Somit wurde sichergestellt, dass die Proben vergleichbar sind und quantitative und qualitative Analysen sinnvoll durchgeführt werden können. Die Ergebnisse in 3.3.1 zeigen, dass es zu keinem Unterschied in der Anzahl der detektierten Tfh-Klonotypen in beiden Gruppen kommt.

4.1.4 Ungleiche Häufigkeitsverteilung in allen Mäusen sowohl in Versuchs- als auch in Kontrollgruppe

Bei der Auswertung der relativen Frequenzen der einzelnen Mäuse der verschiedenen Versuchsgruppen untereinander fiel auf, dass es sowohl in der Kontroll- als auch in der Versuchsgruppe sehr wenige Klonotypen gab, die hochfrequent vorkommen, die große Mehrheit kam dabei nur vereinzelt vor (vgl.

3.3.2). Die Frequenzen der hochfrequenten Klonotypen schwankten in beiden Gruppen stark. Diese Verteilung konnte so auch bereits in Versuchen mit naiven Mäusen detektiert werden.^{82,86} Dieses spricht für die große Diversität und Vielfalt des Rezeptorrepertoires.

Es konnte durch die Immunisierung mit vWFA2 auch kein signifikanter Unterschied in der relativen Frequenz der Klonotypen mit Hilfe des Gini-Koeffizienten zwischen den Gruppen gezeigt werden.

Dieses war zu erwarten, da bisherige Analysen der Tfh-Zellen ebenfalls eine spezifische Antwort auf ein spezifisches Antigen nur schwer detektieren konnten. Dieses liegt vor allem daran, dass die Anzahl an nicht autoantigenspezifischen sog. Bystander-T-Zellen, also T-Zellen die durch andere Antigene aktiviert werden und daraufhin proliferieren, enorm ist.⁴⁹ Das Immunsystem scheint nicht immer nur spezifisch zu antworten.

In diesem Fall ließe sich diese Erkenntnis besonders über zwei Mechanismen erklären. Zum einen wurde beiden Gruppen bei der Immunisierung das Adjuvants TiterMax injiziert. Wie schon in 4.1.2 beschrieben kam es daraufhin zu einer Entzündungsreaktion in den Hinterläufen der Mäuse. Es kam zur Ausbildung von Nekrosen und gestressten Zellen, die endogene Peptide freisetzen. So wurden in beiden Gruppen auch T-Zellen durch diese freigesetzten endogenen Peptid-Epitope aktiviert. Somit fand auch in der Versuchsgruppe eine nicht nur spezifische Immunreaktion auf das Autoantigen statt, sondern auch eine Bystander-Aktivierung auf diese präsentierten endogenen Peptid-Epitope,

Es zweiter Mechanismus kann dazu führen, dass es zur Aktivierung und Proliferation von vielen verschiedenen Tfh-Zellen gekommen ist. Das injizierte Autoantigen vWFA2 besteht aus fast 200 Aminosäuren⁶⁰ und ist damit immer noch relativ groß. Die Peptide, die normalerweise auf einem MHCII präsentiert werden, sind 13-25 Aminosäuren lang.⁸⁷ Somit ist es durchaus vorstellbar, dass das Autoantigen aus mehr als einem Epitop besteht und somit auch verschiedene Tfh-Zellen aktiviert wurden.⁶³

Es lässt sich also alleine durch diese zwei Mechanismen erklären, warum nicht nur spezifisch autoreaktive Zellen proliferieren und es in beiden Gruppen zu einzelnen hochfrequenten Klonotypen gekommen ist.

Es lassen sich also alleine mit der Häufigkeitsverteilung keine Hinweise auf autoreaktive Zellen erkennen. Deshalb wurde das Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Repertoire genauer analysiert, um autoreaktive Zellen zu identifizieren.

4.1.5 Akkumulation von autoreaktiven spezifischen Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen

In der genaueren Analyse des Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Repertoires wurden bestimmte Merkmale des T-Zell-Rezeptors untersucht, um hierdurch Hinweise auf akkumulierende Zellen mit bestimmten Merkmalen zu erhalten, die damit für eine Autoreaktivität sprechen.

Dabei fällt bei dem Vergleich der Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Repertoires der beiden Gruppen miteinander kein Unterschied in der CDR3-Länge auf (vgl. 3.3.3) Somit ist es nicht möglich, über die CDR3-Längen-Verteilung auf eine Antigen-spezifität zu schließen.

Allerdings ist eine Verschiebung in der Benutzung der V-Segmente aufgefallen. (vgl. 3.3.3) In der Versuchsgruppe wird das V2-Gen-Segment hochsignifikant häufiger benutzt.

Solche vermehrte Nutzung von einzelnen V-Gen-Segmenten ist bereits bei SLE und RA in menschlichen Blutproben entdeckt worden.⁴⁴ Ähnliches wurde auch bei Proben der Synovia aus Kniegelenken bei Patienten mit RA gefunden. Auch hier fielen eine vermehrte Nutzung bestimmter V-Gen-Segmente auf.⁸⁸

Auch schon bei der Immunisierung mit mCOL7c-GST konnte bereits eine Verschiebung in der Benutzung der V-Segmente gezeigt werden. In dem Fall kam es allerdings zu einer Akkumulation von Tfh-Zellen, welche das V3-Gen-Segment vermehrt benutzt haben.^{62,63}

Diese unterschiedliche V-Segment Akkumulation könnte durch folgenden Hintergrund zu erklären sein. Für die Immunisierung mit vWFA2 wurden C57BL/6 Mäuse verwendet, da dieser Stamm auch bei der Etablierung dieser Methode verwendet wurde.⁶⁰ Bei diesem Stamm wurde die H2s MHC-Klasse II des SJL/J Stammes eingefügt eingefügt.

Bei der Immunisierung mit mCOL7c-GST wurden hingegen SJL/J-Mäuse verwendet, die eine genomische Deletion innerhalb des V-Segment-Locus des β -Rezeptors

haben.⁸⁹ Somit ist die Anzahl an V-Segmenten bei diesem Stamm kleiner. Allein dieser Unterschied der Maus-Stämme könnte zu diesem abweichenden Ergebnis geführt haben.

Dazu kommt, dass bei der Immunisierung mit mCOL7c-GST ein anderes Antigen verwendet wurde, welches zusätzlich mit einem xenogenen GST-Fusionsprotein verbunden ist. Durch das andere Antigen und das zusätzlichen Xenogen lässt sich vermuten, dass auch andere Tfh-Zellen aktiviert wurden und somit auch eine unterschiedliche V-Segment Nutzung denkbar ist.

Dass es überhaupt zu einer vermehrten V2-Gen-Segment-Nutzung gekommen ist, könnte dadurch zustande gekommen sein, dass naive T-Lymphozyten, die das V2-Gen-Segment benutzen, das Autoantigen erkennen, daraufhin geprägt werden und klonal expandieren. Man könnte daher die Hypothese aufstellen, dass unter diesen Tfh-Zellen, die das V2-Gen-Segment benutzen, die autoreaktiven Zellen zu finden sind und sie somit zu einem erheblichen Teil zur Pathogenese der EBA beitragen.

Um diesen Zusammenhang zu verifizieren, wäre es spannend, monoklonale Antikörper zu entwickeln, die speziell gegen das V2-Gen-Segment des TZR β gerichtet sind, den TZR blockieren und somit die Prägung der T-Lymphozyten ausbleibe.

Dadurch wäre es denkbar, dass weniger bis keine autoreaktiven Tfh-Lymphozyten entstehen. Somit würde die T-Zell-Hilfe bei der Aktivierung und Differenzierung der autoreaktiven B-Zelle wegfallen, und es gäbe weniger oder keine Autoantikörper.

Somit würde das zu der Hypothese führen, dass bei der aktiven Immunisierung mit dem vWFA2 bei Blockung der T-Zell-Rezeptoren, die das V2-Gen-Segment benutzen, durch monoklonale Antikörper die Mäuse wesentlich weniger und schwächere Symptome zeigen oder im besten Falle keine Krankheitssymptomatik aufweisen.

Sollte sich diese Hypothese bestätigen lassen, könnten sich hieraus eventuell neue individuelle Therapieansätze für den erkrankten Patienten ableiten lassen. Die

bisherigen Therapieansätze der EBA bestehen aus lokalen oder bei schweren Verläufen systemischen immunsuppressiven Therapieschemata. Es werden zumeist systemische Glukokortikoide als erste Wahl eingesetzt. Oft werden zusätzlich oder, um Steroide zu sparen, weitere Immunsuppressiva wie, wie z.B. Azathioprin, Cyclophosphamid, Colchizin, Methotrexat und weitere eingesetzt. Außerdem wurden

weitere therapeutische Optionen wie hochdosierte intravenöse Immunglobulin oder Plasmapherese und Immunabsorption beschrieben.⁸³

Insgesamt sind die bisherigen Ansätze allerdings sehr unspezifisch und führen somit auch zu erheblichen Nebenwirkungen. Somit würden Therapieansätze, bei denen durch ein Immunmonitoring sehr individuell autoreaktive Zellen ausfindig gemacht werden können und dann eventuell ausgeschaltet werden können, zu einem enormen Vorteil für den Patienten führen. Die Nebenwirkungen wäre wahrscheinlich deutlich geringer, da eine solche individuelle Therapie nur einzelne autoreaktive Zellen angreifen würde und nicht das gesamte Immunsystem.

Allerdings müsste man dazu zunächst feststellen, ob es eine entsprechende Korrelation der V-Gen-Segment Benutzung auch bei an EBA erkrankten Patienten gibt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Zelloberflächenphänotyp von Tfh-Zellen bei der Maus und dem Menschen nicht völlig übereinstimmen.¹¹ Außerdem ist auch die Zusammensetzung des TZR bei der Maus und dem Menschen unterschiedlich. Besonders variiert auch die Anzahl der V-Gensegmente. Da schon durch den anderen Mausstamm und/oder das andere Antigen eine abweichende Akkumulation von Tfh-Zellen mit unterschiedlicher Benutzung der V-Segmente gekommen ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass sich auch hier ein abweichendes Muster beim Menschen zeigt. Insgesamt wirft dieses Ergebnis daher viele weitere Fragen aber auch Ansatzpunkte für weitere Forschung auf und könnte zum Verständnis der Pathogenese und daraus resultierenden neuen Therapieansätzen beitragen.

4.2 Die Diversität des Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Repertoires nimmt bei Autoimmunität ab

Das T-Lymphozyten-Repertoire ist unglaublich divers. Die Ergebnisse konnten aber trotzdem einen Rückgang dieser Diversität zeigen (vgl. 3.3.4). Bei dem Vergleich der Klonotypen von drei Mäusen konnte eine deutlich größere Übereinstimmung in der Versuchsgruppe gezeigt werden. Um dieses Ergebnis zu quantifizieren, wurden zwei Indices benutzt. Dabei wird besonders bei dem Morisita-Horn Index, der die hochfrequenten Klonotypen stärker wichtet, deutlich, dass es nicht nur mehr identische Klonotypen in der Versuchsgruppe gibt und sich das Repertoire somit ähnlicher wird, sondern besonders auch die hochfrequenten Klonotypen ähnlicher

werden. In der Literatur spricht man dabei von privaten TZR-Klonotypen (*eng. private T-cell-receptor clonotypes*), die nur in einem oder wenigen Individuen vorkommen oder von öffentlichen TZR-Klonotypen (*engl. public T-cell-receptore clonotypes*), die bei einer Immunantwort in der Mehrheit der Individuen zu finden sind. Dabei wird davon ausgegangen, dass die meisten Immunreaktionen sowohl private, wie auch öffentliche Klonotypen hervorrufen.⁴⁶ Dabei konnte bisher gezeigt werden, dass eine ungerichtete Immunisierung keine größere Übereinstimmung des T-Zell-Repertoires zeigt.⁴⁶

Dass in dieser Arbeit eine Abnahme der Diversität nach Immunisierung mit vWFA2 gefunden wurde und es zur Akkumulation von öffentlichen Klonotypen in der Versuchsgruppe gekommen ist, könnte dabei auf zwei Mechanismen beruhen. Zum einen wurden für die Analyse das Repertoire von Tfh-Zellen aus den Keimzentren untersucht. Diese sind bei ihrer Differenzierung stark von der TZR-Signalstärke abhängig, und zusätzlich werden die Tfh-Zellen bei ihrer Einwanderung in die B-Zell-Zone im Lymphknoten auf Antigen-spezifität selektiert. Daher geht man davon aus, dass diese Zellen sehr antigenspezifisch sind.¹¹ Es können also nur die Zellen zu Tfh-Zellen differenzieren, die stark an das Antigen binden.

Zusätzlich kommt dazu, dass in der Versuchsgruppe mit einem Autoantigen Immunisiert wurde. Es wurde schon gezeigt, dass vermehrt öffentliche Klonotypen bei Autoimmunität gefunden werden.⁹⁰

Somit wurden nach der Immunisierung deutlich mehr öffentliche Tfh-Zellen in allen Mäusen selektiert, als in der Kontrollgruppe. Man könnte die Hypothese aufstellen, dass hierunter besonders die Tfh-Zellen zu finden sind, die besonders gut an das präsentierte Autoantigen gebunden haben. Da dieses Autoantigen in allen Mäusen der Versuchsgruppe gleich ist, scheinen hier auch trotz der riesigen Diversität der Zellen die identischen Tfh-Zellen aktiviert zu werden.

Trotzdem ist es auch zu einer privaten Immunantwort gekommen. Dieses ist dadurch zu erklären, dass durch die Immunisierung mit TM endogene Peptide freigesetzt wurden. Diese zufällige Präsentation von endogenen Peptid-Epitopen hat dann in jeder Maus auch für eine private Akkumulation von Tfh-Zellen gesorgt.

Das würde bedeuten, dass unter den öffentlichen Klonotypen auch besonders autoreaktive Klonotypen zu finden sein müssten.

Diese Annahme wird nochmal verstärkt, wenn man das Ergebnis der Analyse in 3.3.5 in Betracht nimmt. Hier wurden die öffentlichen Klonotypen, die zwischen 3 verschiedenen Mäusen gefunden wurden, näher hinsichtlich ihrer V-Segment-Nutzung analysiert. 40% dieser öffentlichen Klonotypen benutzen in ihrem TZR die V2-Sequenz.

Dieses führt zur Hypothese, dass es besonders diese öffentlichen Tfh-Zellen mit V2-Segment sind, die nach Immunisierung mit vWFA2 akkumulieren und somit autoreaktiv sind.

Um aus diesen Klonen aber die genauen antigenspezifischen Klonotypen herauszufinden, braucht es noch weitere Versuche.

Man könnte dafür bereits etablierte Methoden benutzen, bei denen man lösliche, künstlich designte MHC II-Komplexe herstellt, sogenannte MHC II-Tetramere. Diese kann man dann mit der gesuchten Antigenbindungssequenz beladen und die entstehenden Komplexe aus MHC-Tetramer und T-Zell durch eine Färbung mit Hilfe von Durchflusszytometrie herausfiltern.⁹¹ Weitere Versuche dazu haben ergeben, dass es durch diese Methode sogar möglich ist, die T-Zellen durch das MHC-Tetramer zu aktivieren.⁹² So wäre es möglich herauszufinden, ob unter den detektierten Klonotypen, wirklich autoreaktive Tfh-Zellen stecken. Hätte man diese identifiziert, würde dieses völlig neue Möglichkeiten für Therapieoptionen bieten. So wäre es zum Beispiel vorstellbar, dass die entsprechenden Tetramere dazu eingesetzt werden könnten, die autoreaktiven T-Zellen gezielt zu zerstören⁹³, oder es ließen sich monoklonale Antikörper gegen die autoreaktiven T-Zellen entwickeln.

4.3 Uniformität des Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Repertoires in kontralateralen Lymphknoten bei EBA

Da in den Analysen gezeigt werden konnte, dass das Repertoire zwischen verschiedenen Mäusen öffentlicher wird und vermehrt identische Klonotypen akkumulieren, war es auch interessant zu erfahren, wie sich das Repertoire in einer Maus verhält. Dafür wurden die Tfh-Zellen aus den Keimzentren der poplitealen Lymphknoten beider Seiten getrennt voneinander analysiert und verglichen.

Es zeigen sich dabei sehr viele identische Klonotypen, die akkumulieren, und zusätzlich fällt auch auf, dass diese sich diese auch noch in ihrer relativen Frequenz ähneln (vgl. 3.3.6).

Es verringert sich also durch die Immunisierung mit vWFA2 die Diversität des Tfh-Zellrepertoires innerhalb einer Maus. Daher kann man darauf schließen, dass die Anzahl der Tfh-Zell-Klone, die für das Autoantigen spezifisch sind, pro Maus begrenzt ist. Dieses wird auch durch frühere Arbeiten unterstützt, die zeigen, dass die Häufigkeit von T-Zell-Vorläufern, die spezifisch für ein Autoantigen sind, in einem Individuum eher gering sind.⁹⁴

Es lassen sich mehrere Szenarien vorstellen, wie es zu der Akkumulation von identischen Klonotypen gekommen ist.

Die Mäuse wurden in beiden Hinterläufen immunisiert. Da die poplitealen Lymphknoten jeweils nur eine Seite drainieren, könnte es in beiden Lymphknoten unabhängig voneinander zu der entsprechenden Immunantwort gekommen sein. Eine weitere Erklärung wäre es, dass die Tfh-Zellen sich zwischen den kontralateralen Lymphknoten austauschen. Dazu müssten die Tfh-Zellen zunächst das Keimzentrum verlassen, um dann über das Blut in den anderen Lymphknoten zu gelangen. Bisher konnte gezeigt werden, dass die Tfh-Zellen zwischen den verschiedenen Keimzentren eines Lymphknotens wandern können⁹⁵, und es wurden bereits bei anderen bullösen Autoimmundermatosen Tfh-Zellen im Blut detektiert^{96,97}. Es scheint also möglich zu sein, dass die Tfh-Zellen im Körper wandern. Und so wäre es auch vorstellbar, dass sie in den kontralateralen Lymphknoten wandern, und somit die große Übereinstimmung auf diesen Austausch zurückzuführen ist. Es wäre auch vorstellbar, dass identische Vorläuferzellen ins Blut ausgeschwemmt werden und so in den kontralateralen Lymphknoten gelangen. Dort könnten sie dann niedrigaffine Konkurrenten verdrängen und sich im Anschluss zu ausgereiften Tfh-Zellen entwickeln.⁶³

Um diese Hypothese der wandernden Tfh-Zellen oder Vorläuferzellen zu verifizieren, wäre es eventuell möglich, die intravitale Mikroskopie (IVM) einzusetzen. Bei dieser ist es möglich, Zellen in vivo zu mikroskopieren. Dabei ist es auch schon gelungen, Migrationen von Zellen zu verfolgen⁹⁸. Schafft man es, speziell die Tfh-Zellen in vivo zu färben, könnte es möglich sein zu schauen, ob diese Zellen wirklich ins Blut und entsprechend auch in den kontralateralen Lymphknoten wandern.

Käme es wirklich zur Wanderung, wäre dieses als ein weiterer Selektionsmechanismus anzusehen. Die Tfh-Zellen würden nicht nur mit den Tfh-Zellen aus demselben Lymphknoten um das Antigen konkurrieren, sondern auch mit denen aus anderen aktivierten Lymphknoten. Das würde bedeuten, dass durch diese weitere Selektion hochaffinere Tfh-Zellen hervorgehen, die dann B-Zell-Hilfe leisten. Damit würden dann auch hochaffinere Antikörper gebildet werden können. Wenn sich dieses bestätigen ließe, könnte dieses eine Bedeutung für Impfstrategien haben. Es ließe sich daraus die Hypothese aufstellen, dass bei einer beidseitigen Impfung durch diesen stärkeren Konkurrenzdruck auch deutlich hochaffinere Antikörper gebildet werden würden.⁶³

5 Zusammenfassung

Follikuläre T-Helferzellen (Tfh-Zellen) sind eine Subpopulation der CD4⁺-T-Helferzellen. Sie sind im Keimzentrum der sekundär lymphatischen Organe zu finden und leisten dort Hilfe bei der Entwicklung von der GC-B-Zelle hin zur hochaffinen antikörperproduzierenden Plasmazelle. Diese Tfh-Zellen sind Ausgangspunkt bei Autoimmunerkrankungen. Es ist bereits bekannt, dass ihre Differenzierung stark von der T-Zell-Rezeptor-Signalstärke abhängt, und daher wird angenommen, dass diese Zellen antigenspezifisch sind. Sie erscheinen durch diese Antigenpezifität besonders gut geeignet, um Veränderungen des Lymphozyten-Repertoires bei Autoimmunität nachzuweisen und Hinweise zur Identifizierung von autoreaktiven Zellen zu erhalten. Im Falle der EBA konnte bereits in einem aktiven Modell gezeigt werden, dass es bei Autoimmunität zu Akkumulation von spezifischen Tfh-Lymphozyten-Rezeptor- β Klonotypen zwischen einzelnen Individuen kommt. Hierbei wurde zur Immunisierung das Peptid mCOI7c-GST benutzt, welches nicht nur aus dem Selbstpeptid (mCol7c), sondern auch aus einem GST-Fusionsprotein besteht. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass GST-spezifische T-Zellen besonders effizient aktiviert werden, daher war nicht auszuschließen, dass die Veränderungen im Repertoire auf diesen GST-Tag zurückzuführen waren.

Um dieses auszuschließen, nutzt dieses Projekt ein weiteres bereits etabliertes aktives Modell der Krankheitsinduktion von Mäusen mit dem rekombinant gewonnenen *von-Willebrand-factor-A-like-domaine-2* (vWFA2). In diesem Modell kommt die Antikörperproduktion ohne ein GST-Fusionsprotein aus. Somit soll ein möglicher Einfluss auf das Repertoire ausgeschlossen werden.

Es werden in der Arbeit die Fragen versucht zu klären, ob Veränderungen im Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Repertoire in dem aktiven Modell der EBA bei Immunisierung mit vWFA2 gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden können, und wie sich die Erkrankung auf die Diversität des Repertoires auswirkt.

Zur Klärung der Fragen wurden zunächst die Keimzentren mit Hilfe der Lasermikrodissektion aus den Lymphknoten extrahiert und die darin enthaltenen Tfh-Lymphozyten mit Hilfe einer multiplex PCR und *Next-Generation-Sequencing* (NGS) identifiziert.

Die Analyse des Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Repertoires konnte dabei zeigen, dass es zu einer Akkumulation von Tfh-Lymphozyten, die das V2-Segment benutzen, bei EBA kommt und dass die Diversität des Repertoires unter Autoimmunität abnimmt, da es zur Akkumulation von identischen Klonotypen zwischen verschiedenen Individuen kommt. Besonders beim Vergleich der identischen Klonotypen zwischen verschiedenen Mäusen fällt eine deutliche Zunahme des V2-Segmentes auf. Somit deutet sich an, dass bei der Krankheitsinduktion besonders die Tfh-Lymphozyten, die das V2-Segment benutzen, beteiligt sind.

Zusätzlich zeigt diese Arbeit, dass der Vergleich des Repertoires der Tfh-Klonotypen, die aus den Keimzentren der beiden kontralateralen poplitealen Lymphknoten innerhalb einer Maus gewonnen werden, zu vermehrt identischen Klonotypen führt.

Aus diesen Erkenntnissen können in weiterführenden Studien individuellere Therapieoptionen gewonnen werden, indem man die autoreaktiven Zellen identifiziert und gezielt depletiert.

6 Literaturverzeichnis

1. Shapira, Y. & Agmon-Levin, N. Defining and analyzing geoepidemiology and human autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* **34**, J168–J177 (2010).
2. Wang, L., Wang, F. S. & Gershwin, M. E. Human autoimmune diseases: A comprehensive update. *Journal of Internal Medicine* **278**, 369–395 (2015).
3. van Beers, J. J. B. C. & Damoiseaux, J. G. M. C. Immune Monitoring upon Treatment with Biologics in Sjögren’s Syndrome: The What, Where, When, and How. *Biomolecules* **11**, 116 (2021).
4. Schmidt, E. & Zillikens, D. Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. *Autoimmunity Reviews* **10**, 84–89 (2010).
5. Theofilopoulos, A. N., Kono, D. H. & Baccala, R. The multiple pathways to autoimmunity. *Nature immunology* **18**, 716–724 (2017).
6. Qi, H. T follicular helper cells in space-time. *Nature Reviews Immunology* **16**, 612–625 (2016).
7. Murphy, K. & Weaver, C. *Janeway Immunologie. Springer Spektrum*, 9. Auflage, 25–27 (2018).
8. MacLennan, I. C. M. Germinal Centers. *Annual Review of Immunology* **12**, 117–139 (1994).
9. Vinuesa, C. G., Linterman, M. A., Goodnow, C. C. & Randall, K. L. T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. *Immunological Reviews* **237**, 72–89 (2010).
10. Crotty, S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* **41**, 529–542 (2014).
11. Vinuesa, C. G., Tangye, S. G., Moser, B. & Mackay, C. R. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* **5**, 853–865 (2005).
12. Sitaru, A. G. *et al.* T Cells Are Required for the Production of Blister-Inducing Autoantibodies in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. *Journal of Immunology* **184**, 1596–1603 (2010).
13. Kyewski, B. & Klein, L. a Central Role for Central Tolerance. *Annual Review of Immunology* **24**, 571–606 (2006).
14. Goodnow, C. C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B. & Vinuesa, C. G. Cellular and

-
- genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* **435**, 590–597 (2005).
15. Hogquist, K. A., Baldwin, T. A. & Jameson, S. C. Central tolerance: Learning self-control in the thymus. *Nature Reviews Immunology* **5**, 772–782 (2005).
 16. Petrie, H. T. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Zoned Out: Functional Mapping of Stromal Signaling Microenvironments in the Thymus. *Annual Review of Immunology* **25**, 649–679 (2007).
 17. Anderson, G., Moore, N. C., Owen, J. J. T. & Jenkinson, E. J. Cellular Interactions in Thymocyte Development. *Annual Review of Immunology* **14**, 73–99 (1996).
 18. Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T. & Zlotnik, A. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *Journal of Immunology* **150**, 4244 LP – 4252 (1993).
 19. Malissen, M. *et al.* Regulation of TCR α and β gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunology Today* **13**, 315–322 (1992).
 20. Bosc, N. *et al.* IMGT overview : the mouse T cell receptor beta TRB genes. Technical report. *IMGT the international ImMunoGeneTics information system* (2005).
 21. Dudley, E. C., Petrie, H. T., Shah, L. M., Owen, M. J. & Hayday, A. C. T cell receptor β chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* **1**, 83–93 (1994).
 22. Krangel, M. S. Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Current opinion in immunology* **21**, 133–139 (2009).
 23. Komori, T., Okada, A., Stewart, V. & Alt, F. W. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* **261**, 1171–1175 (1993).
 24. Yassai, M. B., Naumov, Y. N., Naumova, E. N. & Gorski, J. A clonotype nomenclature for T cell receptors. *Immunogenetics* **61**, 493–502 (2009).
 25. Laydon, D. J., Bangham, C. R. M. & Asquith, B. Estimating T-cell repertoire diversity: Limitations of classical estimators and a new approach. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **370**, 1675 (2015).
 26. Mombaerts, P., Anderson, S. J., Perlmutter, R. M., Mak, T. W. & Tonegawa, S. An activated Ick transgene promotes thymocyte development in rag-1 mutant

-
- mice. *Immunity* **1**, 261–267 (1994).
27. Krangel, M. S., Carabana, J., Abbarategui, I., Schlimgen, R. & Hawwari, A. Enforcing order within a complex locus: Current perspectives on the control of V(D)J recombination at the murine T-cell receptor α/δ locus. *Immunological Reviews* **200**, 224–232 (2004).
 28. Bosc, N. *et al.* IMGT overview : the mouse T cell receptor alpha TRA genes. Technical report. *IMGT the international ImMunoGeneTics information system* (2005).
 29. Hogquist, K. A. *et al.* Identification of a naturally occurring ligand for thymic positive selection. *Immunity* **6**, 389–399 (1997).
 30. Kisielow, P., Teh, H. S., Bluthmann, H. & von Boehmer, H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* **335**, 730–733 (1988).
 31. Laufer, T. M., DeKoning, J., Markowitz, J. S., Lo, D. & Glimcher, L. H. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* **383**, 81–85 (1996).
 32. Hogquist, K. A. *et al.* T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76**, 17–27 (1994).
 33. Starr, T. K., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. P Ositive and N Egative S Election of T C Ells . *Annual Review of Immunology* **21**, 139–176 (2003).
 34. Sprent, J. & Kishimoto, H. The thymus and central tolerance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **356**, 609–616 (2001).
 35. Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G. J. & Scollay, R. The generation and fate of thymocytes. *Seminars in immunology* **2**, 3–12 (1990).
 36. Surh, C. D. & Sprent, J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* **372**, 100–103 (1994).
 37. Von Andrian, U. H. & Mempel, T. R. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nature Reviews Immunology* **3**, 867–878 (2003).
 38. Mempel, T. R., Henrickson, S. E. & Von Andrian, U. H. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* **427**, 154–159 (2004).
 39. Kapsenberg, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews Immunology* **3**, 984–993 (2003).

-
40. Iberg, C. A., Jones, A. & Hawiger, D. Dendritic Cells As Inducers of Peripheral Tolerance. *Trends in immunology* **38**, 793–804 (2017).
 41. Wambre, E., James, E. A. & Kwok, W. W. Characterization of CD4+ T cell subsets in allergy. *Current opinion in immunology* **24**, 700–706 (2012).
 42. Lythe, G., Callard, R. E., Hoare, R. L. & Molina-París, C. How many TCR clonotypes does a body maintain? *Journal of Theoretical Biology* **389**, 214–224 (2016).
 43. Six, A. *et al.* The past, present, and future of immune repertoire biology - the rise of next-generation repertoire analysis. *Frontiers in Immunology* **4**, 1–16 (2013).
 44. Liu, X. *et al.* T cell receptor β repertoires as novel diagnostic markers for systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **78**, 1070–1078 (2019).
 45. Nielsen, S. C. A. & Boyd, S. D. Human adaptive immune receptor repertoire analysis—Past, present, and future. *Immunological Reviews* **284**, 9–23 (2018).
 46. Thomas, N. *et al.* Tracking global changes induced in the CD4 T-cell receptor repertoire by immunization with a complex antigen using short stretches of CDR3 protein sequence. *Bioinformatics* **30**, 3181–3188 (2014).
 47. Harden, J. L., Hamm, D., Gulati, N., Lowes, M. A. & Krueger, J. G. Deep Sequencing of the T-cell Receptor Repertoire Demonstrates Polyclonal T-cell Infiltrates in Psoriasis. *F1000Research* **4**, 460 (2015).
 48. Thapa, D. R. *et al.* Longitudinal analysis of peripheral blood T cell receptor diversity in patients with systemic lupus erythematosus by next-generation sequencing. *Arthritis Research and Therapy* **17**, 1–12 (2015).
 49. Ritvo, P.-G. *et al.* High-resolution repertoire analysis reveals a major bystander activation of Tfh and Tfr cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**, 9604–9609 (2018).
 50. Kim, S. J. *et al.* Increased cathepsin S in Prdm1(-/-) dendritic cells alters the T(FH) cell repertoire and contributes to lupus. *Nature immunology* **18**, 1016–1024 (2017).
 51. Kasperkiewicz, M. *et al.* Epidermolysis Bullosa Acquisita: From Pathophysiology to Novel Therapeutic Options. *Journal of Investigative Dermatology* **136**, 24–33 (2016).

-
52. Woodley, D. T. *et al.* Identification of the Skin Basement-Membrane Autoantigen in Epidermolysis Bullosa Acquisita. *New England Journal of Medicine* **310**, 1007–1013 (1984).
 53. Wegener, H., Paulsen, H. & Seeger, K. The cysteine-rich region of type VII collagen is a cystine knot with a new topology. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 4861–4869 (2014).
 54. Leineweber, S., Schönig, S. & Seeger, K. Insight into interactions of the von-Willebrand-factor-A-like domain 2 with the FNIII-like domain 9 of collagen VII by NMR and SPR. *FEBS Letters* **585**, 1748–1752 (2011).
 55. Csorba, K. *et al.* Blister-inducing antibodies target multiple epitopes on collagen VII in mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **18**, 1727–1739 (2014).
 56. Chen, M. *et al.* The cartilage matrix protein subdomain of type VII collagen is pathogenic for epidermolysis bullosa acquisita. *American Journal of Pathology* **170**, 2009–2018 (2007).
 57. Woodley, D. T. *et al.* Induction of epidermolysis bullosa acquisita in mice by passive transfer of autoantibodies from patients. *Journal of Investigative Dermatology* **126**, 1323–1330 (2006).
 58. Iwata, H. *et al.* Radiosensitive Hematopoietic Cells Determine the Extent of Skin Inflammation in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. *Journal of Immunology* **195**, 1945–1954 (2015).
 59. Sitaru, C. *et al.* Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice. *Journal of Immunology* **177**, 3461–3468 (2006).
 60. Iwata, H. *et al.* B Cells, Dendritic Cells, and Macrophages Are Required To Induce an Autoreactive CD4 Helper T Cell Response in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. *Journal of Immunology* **191**, 2978–2988 (2013).
 61. Tiburzy, B. *et al.* Persistent autoantibody-production by intermediates between short-and long-lived plasma cells in inflamed lymph nodes of experimental epidermolysis bullosa acquisita. *PLoS ONE* **8**, (2013).
 62. Niebuhr, M. Assessment of the T-lymphocyte Receptor Repertoire in the Experimental Model of Epidermolysis Bullosa Acquisita. *Rer. nat. Diss.* (Lübeck, 2019).

-
63. Niebuhr, M. *et al.* Receptor repertoires of murine follicular T helper cells reveal a high clonal overlap in separate lymph nodes in autoimmunity. *eLife* **10**, e70053 (2021).
 64. LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
 65. Tal, M., Silberstein, A. & Nusser, E. Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 9976–9980 (1985).
 66. Maass, S. C. Das passive Antikörpertransfermodell der Epidermolysis Bullosa Acquisita: Die Produktion endogener Antikörper gegen injizierte Fremdproteine und die Anwesenheit aktivierter T-Zellen in der Haut führen zu verstärkter Blasenbildung. *Rer. nat. Diss.* (Lübeck, 2015).
 67. Bieber, K., Koga, H. & Nishie, W. In vitro and in vivo models to investigate the pathomechanisms and novel treatments for pemphigoid diseases. *Experimental Dermatology* **26**, 1163–1170 (2017).
 68. Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. & Vandesompele, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology* **8**, R19–R19 (2007).
 69. Kalies, K., Blessenohl, M., Nietsch, J. & Westermann, J. T Cell Zones of Lymphoid Organs Constitutively Express Th1 Cytokine mRNA: Specific Changes during the Early Phase of an Immune Response. *Journal of Immunology* **176**, 741 LP – 749 (2006).
 70. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* **3** (2002).
 71. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
 72. Fährnich, A. *et al.* ClonoCalc and ClonoPlot: Immune repertoire analysis from raw files to publication figures with graphical user interface. *BMC Bioinformatics* **18**, 1–6 (2017).
 73. Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T. & Stamatakis, A. PEAR: a fast and accurate

-
- Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics* **30**, 614–620 (2014).
74. Ewing, B. & Green, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research* **8**, 186–194 (1998).
75. Nazarov, V. I. *et al.* tcR: an R package for T cell receptor repertoire advanced data analysis. *BMC Bioinformatics* **16**, 175 (2015).
76. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*. (2018).
77. Madi, A. *et al.* T-cell receptor repertoires share a restricted set of public and abundant CDR3 sequences that are associated with self-related immunity. *Genome Research* **24**, 1603–1612 (2014).
78. Best, K., Oakes, T., Heather, J. M., Shawe-Taylor, J. & Chain, B. Computational analysis of stochastic heterogeneity in PCR amplification efficiency revealed by single molecule barcoding. *Scientific reports* **5**, 14629 (2015).
79. Gastwirth, J. L. The Estimation of the Lorenz Curve and Gini Index. *The Review of Economics and Statistics* **54**, 306–316 (1972).
80. JACCARD & P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles* **44**, 223–270 (1908).
81. Rempala, G. A. & Seweryn, M. Methods for diversity and overlap analysis in T-cell receptor populations. *Journal of mathematical biology* **67**, 1339–1368 (2013).
82. Fähnrich, A. *et al.* CD154 costimulation shifts the local T-cell receptor repertoire not only during thymic selection but also during peripheral T-dependent humoral immune responses. *Frontiers in Immunology* **9**, 1019(2018).
83. Koga, H. *et al.* Epidermolysis bullosa acquisita: The 2019 update. *Frontiers in Medicine* **5**, 362(2019).
84. Riteau, N. *et al.* Water-in-Oil-Only Adjuvants Selectively Promote T Follicular Helper Cell Polarization through a Type I IFN and IL-6-Dependent Pathway. *Journal of immunology* **197**, 3884–3893 (2016).
85. Merckenschlager, J. *et al.* Dynamic regulation of T(FH) selection during the germinal centre reaction. *Nature* **591**, 458–463 (2021).
86. Oakes, T. *et al.* Quantitative characterization of the T cell receptor repertoire of naïve and memory subsets using an integrated experimental and

-
- computational pipeline which is robust, economical, and versatile. *Frontiers in Immunology* **8**, 1–17 (2017).
87. Natarajan, K. *et al.* The Role of Molecular Flexibility in Antigen Presentation and T Cell Receptor-Mediated Signaling. *Frontiers in immunology* **9**, 1657 (2018).
 88. Sun, W. *et al.* Skewed T-cell receptor BV14 and BV16 expression and shared CDR3 sequence and common sequence motifs in synovial T cells of rheumatoid arthritis. *Genes and Immunity* **6**, 248–261 (2005).
 89. Behlke, M. A., Chou, H. S., Huppi, K. & Loh, D. Y. Murine T-cell receptor mutants with deletions of beta-chain variable region genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 767–771 (1986).
 90. Madi, A. *et al.* T-cell receptor repertoires share a restricted set of public and abundant CDR3 sequences that are associated with self-related immunity. *Genome research* **24**, 1603–1612 (2014).
 91. Altman, J. D. *et al.* Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* **274**, 94–96 (1996).
 92. Huang, J. *et al.* Detection, phenotyping, and quantification of antigenspecific T cells using a peptide-MHC dodecamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, E1890–E1897 (2016).
 93. Yuan, R. R. *et al.* Targeted deletion of T-cell clones using alpha-emitting suicide MHC tetramers. *Blood* **104**, 2397–2402 (2004).
 94. Jenkins, M. K. & Moon, J. J. The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude. *The Journal of immunology* **188**, 4135–4140 (2012).
 95. Shulman, Z. *et al.* T follicular helper cell dynamics in germinal centers. *Science* **341**, 673–677 (2013).
 96. Hennerici, T. *et al.* Increased frequency of t follicular helper cells and elevated interleukin-27 plasma levels in patients with Pemphigus. *PLoS ONE* **11**, 1–15 (2016).
 97. Li, Q. *et al.* Follicular Helper T Cells (Tfh) and IL-21 Involvement in the Pathogenesis of Bullous Pemphigoid. *PLoS ONE* **8**, 1–7 (2013).
 98. Halin, C., Rodrigo Mora, J., Sumen, C. & von Andrian, U. H. in Vivo Imaging of Lymphocyte Trafficking. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 581–603 (2005).

-
99. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* **9**, 676–682 (2012).
 100. Bolotin, D. A. *et al.* MiTCR: software for T-cell receptor sequencing data analysis. *Nature methods* **10**, 813–814 (2013).

7 Anhang

7.1 Verwendete Chemikalien und Kits

Für diese Arbeit wurden die in Tabelle 7.1 genannten Chemikalien und Kits verwendet.

Tabelle 7.1 Verwendete Chemikalien und Kits

Name	Hersteller
Aceton 99,8%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Agarose peqGold	VWR International GmbH, Deutschland
Aquatex	Merck KGaA, Deutschland
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer AG, Deutschland
Bovines Serum Albumin (IgG-frei)	Sigma-Aldrich Inc., USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Inc., USA
Chloroform 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue	Sigma-Aldrich Inc., USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific, USA
N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Inc., USA
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Inc., USA
5x DNA Loading Buffer Blue	Bioline Reagents, UK
DNase I	Thermo Fisher Scientific, USA
dNTP Mix 10mM	Thermo Fisher Scientific, USA
Einbettmedium	Leica Instruments GmbH, Deutschland
Entellan	Merck KGaA, Deutschland
Eosin-G 1%	Merck KGaA, Deutschland
Ethanol 99.8%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Essigsäure 100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
ExtrAvidin alkalische Phosphatase	Sigma-Aldrich Inc., USA
ExtrAvidin Peroxidase	Sigma-Aldrich Inc., USA
Fast Blue RR Salt	Sigma-Aldrich Inc., USA
Fast Red RR Salt	Sigma-Aldrich Inc., USA
Formaldehyd 37%	Merck KGaA, Deutschland
Formamid 99%	Sigma-Aldrich Inc., USA

Glycerol 99.5%	Sigma-Aldrich Inc., USA
Hämalaunlösung (Mayers)	Merck KGaA, Deutschland
HyperLadder 100bp	Bioline Reagents, UK
immunPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena, Deutschland
Isopropanol 99.95%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ketanest S (25mg/ml)	Pfizer Inc., USA
Liquid DAB+ Substrate	Agilent Technologies, Inc., USA
2-Mercaptoethanol (98%)	Sigma-Aldrich Inc., USA
Methanol 99.9%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Midi Gel Adapter	Thermo Fisher Scientific, USA
MiSeq Reagent Kit v2 300 cycle	Illumina INC, USA
Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich Inc., USA
MTB1vc reagent system (i1-18)	iRepertoire Inc., USA
Multiplex PCR Kit	QIAGEN N.V., Niederlande
Naphthol AS-MX Phosphat	Sigma-Aldrich Inc., USA
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich Inc., USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Deutschland
Natriumchlorid Lösung 0,9%	Braun AG, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Thermo Fisher Scientific, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
NuPAGE Antioxidant	Thermo Fisher Scientific, USA
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gel	Thermo Fisher Scientific, USA
NuPAGE MES SDS Running Buffer	Thermo Fisher Scientific, USA
OneStep RT-PCR Kit	QIAGEN N.V., Niederlande
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, USA
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
PerfeCTa NGS Quantification Kit	Quantabio, USA
PhiX Control v3	Illumina INC, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN N.V., Niederlande
QuantiFluor RNA System	Promega Corporation, USA
Rompun (20mg/ml Xylazine)	Bayer Vital GmbH, Deutschland
Roti-GelStain	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

Salzsäure 37%	Sigma-Aldrich Inc., USA
SYBR Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, USA
TaqMan Universal PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, USA
TiterMax classic	Sigma-Aldrich Inc., USA
Tris base	Sigma-Aldrich Inc., USA
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH, Deutschland
UltraPure Glycine	Thermo Fisher Scientific, USA
Xylol 99%	Merck KGaA, Deutschland

7.2 Verwendete Lösungen und Puffer

Für diese Arbeit wurden die in Tabelle 7.2 genannten Lösungen und Puffer verwendet.

Tabelle 7.2 Verwendete Lösungen und Puffer

Name	Zusammensetzung
APAAP	0.5mM Naphthol AS-MX Phosphat, 250mM N,N-Dimethylformamid, 1mM Levamisol, Tris-Puffer 0.1M
Coomassie Blue Entfärbelösung	10% v/v Essigsäure, 40% v/v methanol, aqua dest.
Coomassie Blue Färbelösung	0.2% w/v Coomassie Brilliant Blue, 10% v/v Essigsäure, 40% v/v Methanol, aqua dest.
DAPI Färbelösung	3.5mM DAPI, PBS
Fast blue Färbelösung	3mM Fast Blue RR Salt, APAAP
Fast red Färbelösung	1.5mM Fast Red RR Salt, APAAP
IHC Antikörper Verdünnungspuffer	1% w/v BSA (IgG-frei), 0.5% w/v NaN ₃ , PBS
Laemmli Puffer	25mM Tris, 192mM Glycin, 0.1% w/v

	SDS, 0.01% w/v Bromphenolblau, Aqua dest.
Library Verdünnungspuffer	10 mM Tris, 0.1% Tween 20, Aqua dest., pH eingestellt auf 8.5
NaOH (1M)	1M NaOH, Aqua dest.
Narkoselösung	100mg/kg Ketanest S, 10mg/kg Rompun, Natriumchlorid 0.9%
PAGE Lauf-Puffer	5% v/v NuPAGE MES SDS Lauf-Puffer, 0.25% Nu-PAGE Antioxidant (nur in der Kathodenkammer, Aqua dest.
PAGE Probenverdünnungspuffer	15mM DTT, 20% v/v Glycerol, 2.5% v/v 2-Mercaptoethanol, 1x Laemmli Puffer
PBS	2.5mM KCl, 1.5mM KH ₂ PO ₄ , 140mM NaCl, 6.5mM Na ₂ HPO ₄ , Aqua dest., pH eingestellt auf 7.25
TEA-Puffer	40mM Tris base, 20mM Essigsäure, 1mM EDTA, Aqua dest., pH eingestellt auf 7.6
TBS-Tween	mM Tris base, 0,05% Tween 20, 0,8% NaCl, Aqua dest., pH eingestellt auf 7.6
Tris-Puffer (0.1M)	0.1M Tris base, Aqua dest., pH eingestellt auf 8.2

7.3 Verbrauchsmaterialien

Für diese Arbeit wurden die in Tabelle 7.3 genannten Verbrauchsmaterialien verwendet.

Tabelle 7.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
26/30G Kanülen	Braun AG, Deutschland
96 Well Multiply PCR Plates	Sarstedt AG & Co., Deutschland
CryoPure Tube 1.6ml	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Membranobjektträger NF 1.0 PEN	Carl Zeiss Microscopy GmbH,

	Deutschland
MicroFine Insulinspritzen 1ml	Becton, Dickinson and Company, USA
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris-Gel 1.0mm, 12well	Life Technologies, USA
Objekträger und Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Deutschland
Omnifix Feindosierungsspritzen 1ml	Braun AG, Deutschland
PARAFILM M	Sigma-Aldrich Inc., USA
PCR Optical Adhesive Cover	Life Technologies, USA
Reaktionsgefäße 0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2ml, 5ml	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Reaktionsgefäße 15ml, 50ml	Nerbe plus, Deutschland
Pipettenspitzen 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Nerbe plus, Deutschland
Pipettenspitzen 10µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Safe Lock Tubes 1.5ml	Eppendorf AG, Deutschland
Skalpellklingen	Dimeda Instrumente GmbH, Deutschland
Superfrost Plus Adhäsionsobjekträger	Thermo Fisher Scientific, USA
Thermanox Deckgläser	Thermo Fisher Scientific, USA

7.4 Verwendete Geräte und Instrumente

Für diese Arbeit wurden die in Tabelle 7.4 genannten Geräte und Instrumente verwendet.

Tabelle 7.4 verwendete Geräte und Instrumente

Name	Hersteller
ABI PRISM 7900 HT	Applied Biosystems, Deutschland
AccuBlock Digital Dry Baths	Labnet International INC, USA
AxioCamHR Digitalkamera	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
AxioCamIC	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland

Axiophotl Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Axioskop 2 plus Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Axiovert 200	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Centrifuge 5417R (Rotor: F-45-30-11)	Eppendorf AG, Deutschland
E BOX VX 5	VILBER LOURMAT GmbH, Deutschland
Elektrische Nagelpfeile	Tchibo GmbH, Deutschland
Eppendorf Research plus Pipetten	Eppendorf AG, Deutschland
FTSS 355-50	CryLaS GmbH, Deutschland
Galaxy Mini Mikrozentrifuge	VWR International GmbH, Deutschland
Gelelektrophorese Criterion Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Hyrax Kryostat C50	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
IKA MS2 Minishaker Vortexer	IKA works INC, USA
Mikrolaser-System SYS63TE/PA7	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
MiniSpin Plus Centrifuge (Rotor: F-45-12-11)	Eppendorf AG, Deutschland
MiSeq System	Illumina INC, USA
Mitsubishi P95DW	Mitsubishi Electric, Japan
Neubauer Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Deutschland
N-XBO 75	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Olympus DP72	Olympus Ag, Deutschland
PALM MicroBeam	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
PerfectBlue Gel System Mini L	VWR International GmbH, Deutschland
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Power Supply LNG 350-6 Economy Line	Heinzinger electronic GmbH,

	Deutschland
Primus 25 Thermal Cycler	Eurofins Genomics GmbH, Deutschland
Primus 96 Plus Thermal Cycler	Eurofins Genomics GmbH, Deutschland
StepOne Plus Real-Time PCR	Thermo Fisher Scientific, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Deutschland
Titramax 100	VWR International GmbH, Deutschland
Quantus Fluorometer	Promega Corporation, USA
Vakuumentrifuge Konzentratoren 5301 (Rotor: F-45-48-11)	Eppendorf AG, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries INC, USA

7.5 Verwendete Software

Für diese Arbeit wurden die in Tabelle 7.5 genannte Software verwendet.

Tabelle 7.5 verwendete Software

Name	Entwickler
ABI 7900 HT detection System 2.4	Applied Biosystems, Deutschland
Adobe Photoshop CS6	Adobe Systems Incorporated, USA
AxioVision 4.9.1.2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
AxioVision 6.1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Clono Suite	Institut für Anatomie, University zu Lübeck, Deutschland (Fähnrich et al. ⁷²)
FASTX Barcode splitter	Hannon Lab, Howard Hughes Medical Institute, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc., USA
ImageJ 1.51j	Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics Germany (Schindelin et al.) ⁹⁹

KIEL	Markus Schilhabel, Institut für klinische Molekularbiologie, Universität Kiel, Deutschland
Microsoft Excel für Mac 2016	Microsoft Deutschland GmbH, Deutschland
Microsoft Word für Mac 2016	Microsoft Deutschland GmbH, Deutschland
MiTCR	Pirogov russische staatliche medizinische Universität, Russland (Bolotin et al.) ¹⁰⁰
PALMRobo v4.8.0.1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Pear 0.9.8	The Exelixis Lab, Heidelberg Institute for Theoretical Studies, Deutschland (Zhang et al.) ⁷³
R 3.4.4	R Foundation for Statistical Computing, Österreich (R Core Team) ⁷⁶
Step One Software v2.3	Thermo Fisher Scientific, USA
tcR	Pirogov russische staatliche medizinische Universität, Russland (Nazarov et al.) ⁷⁵

7.6 Antikörper

Für die immunhistochemischen Färbungen (IHC) und die Immunfluoreszenzfärbungen (IF) wurden die in Tabelle 7.6 genannten Antikörper verwendet.

Tabelle 7.6: Verwendete Antikörper

Antikörper	Klon	Hersteller
Biotin Hamster anti-Maus TCR β -Kette	H57-597	Becton, Dickinson and Company, USA
Biotin Kaninchen anti-Ratten IgG	polyklonal	Southern Biotech, Inc., USA

Esel anti-Maus IgG FITC	polyklonal	Jackson ImmunoResearch, USA
Ratte anti-Maus CD45R (B220)	RA3-6B2	Becton, Dickinson and Company, USA
Ratte anti-Maus Gr-1 (Ly6G)	RB6-8C5	Becton, Dickinson and Company, USA
Ratte anti-Maus Ki-67	16A8	BioLegend, USA

7.7 Verwendete Primer

Für die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) wurden die in Tabelle 7.7 genannten Primer für die Amplifizierung genutzt.

Tabelle 7.7 Verwendete Primer

Angegeben sind die Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer, sowie wenn benutzt die Sodensequenz, die verwendete Konzentration und die Referenznummer der Vorlage, die zur Erstellung des Primers verwendet wurde.

Primer		Sequenz	Konzentration (mM)	NCBI Accession Number
AID	Vorwärts	5'CGTGGTGAAGAGGAGAGATAGTG	25	NM_009645.2
	Rückwärts	5'-CAGTCTGAGATGTAGCGTAGGAA	25	
β Actin	Vorwärts	5'GATGCTCCCCGGGCTGTATT	25	NM007393
	Rückwärts	5'GGGGTACTTCAGGGTCAGGA	25	
FoxP3	Vorwärts	5'ACTCGCATGTTCGCCTAC	90	NM054039.2
	Rückwärts	5'TCCCTTCTCGCTCTCCACTC	90	
	Sonde	5'CCGCCACCTGGAAGAATGCCATCCG	20	
GAPDH	Vorwärts	5'GACGGCCGCATCTTCTTGT	90	NM

	Rückwärts	5'CACACCGACCTTCACCATTTT	90	008084.3
	Sonde	5'CAGTGCCAGCCTCGTCCCGTAGA	20	
GATA3	Vorwärts	5'GGTACTGGGCACTACCTTTG	25	NM
	Rückwärts	5'TGGTGGTGGTCTGACAGTTC	25	008091.3
IFN γ	Vorwärts	5'GCAAGGCGAAAAAGGATGC	90	NM
	Rückwärts	5'GACCACTCGGATGAGCTCATTG	90	008337.3
	Sonde	5'TGCCAAGTTTGAGGTCAACAACCCAC AG	20	
IL4	Vorwärts	5'GAGACTCTTTCGGGCTTTTCG	90	NM
	Rückwärts	5'AGGCTTTCAGGAAGTCTTTCAG	90	021283.2
	Sonde	5'CCTGGATTCATCGATAAGCTGCACCA TG	20	
IL10	Vorwärts	5'TCCCTGGGTGAGAAGCTGAAG	90	NM
	Rückwärts	5'CACCTGCTCCACTGCCTTG	90	010548.2
	Sonde	5'CTGAGGCGCTGTCATCGATTTCTCCC	20	
MLN51	Vorwärts	5'CCAAGCCAGCCTTCATTCTTG	90	NM
	Rückwärts	5'TAACGCTTAGCTCGACCACTCTG	90	138660.2
	Sonde	5'CACGGGAACCTTCGAGGTGTGCCTAAC	20	
T-bet	Vorwärts	5'ACTGGATGCGACAGGAAG	25	NM
	Rückwärts	5'GCGGCTGGTACTTATGGAG	25	019507.2

7.8 Zusammenfassung der T-Lymphozyten-Rezeptor- β -Klonotypen

Tabelle 7.8 Zusammenfassung der T-Lymphozyten-Rezeptor- β -Klonotypen

Immunisierung	Maus	Pop.LK	Volumen [x10 ⁷ μ m ³]	Raw reads [n x10 ⁶]	TZR- Sequenzen [n x10 ⁶]	Gefundene TZR- Klonotypen [n]	TZR- Klonotypen >Median [n]
PBS/TM	1	links	3,74	1,86	1,66	9338	4653
		rechts	3,90	0,76	0,60	6951	3421
	2	links	3,73	1,79	1,29	1652	826
		rechts	3,79	0,72	0,50	4218	2087
	3	links	3,82	1,53	1,31	3361	1680
		rechts	3,19	0,73	0,59	2973	1478
vWFA2/TM	4	links	3,90	1,54	1,10	4351	2160
	5	links	2,91	1,25	1,00	3616	1794
	6	links	3,83	1,30	0,94	5268	2615
	1	links	3,66	1,83	1,16	1332	661
		rechts	3,86	1,35	0,47	3514	1754
	2	links	2,43	2,00	1,14	3758	1871
3	rechts	3,62	1,59	0,85	2495	1236	
	links	3,20	1,98	1,26	1452	726	
	rechts	3,89	1,33	1,10	3821	1896	
4	links	3,20	1,30	1,13	5374	2681	
5	links	3,58	1,13	0,98	6216	3090	
6	links	3,42	1,26	1,01	7537	3732	

7.9 Liste der CRD3-Aminosäuresequenzen der Tfh-Lymphozyten-Rezeptor- β -Klonotypen, die von 3 Mäusen geteilt werden und das V2-Segment enthalten.

1. ASSQEGTGNSDYT
2. ASSQEGTANSDYT
3. ASSQEGTDNERLF
4. ASSQEGTGGDTQY
5. ASSQTGENTLY
6. ASSQDGTGDEQY
7. ASSQDGTGGYEQY
8. ASSQDLDTQY
9. ASSQDLGEQY
10. ASSQDPGQAPL
11. ASSQDRDTQY
12. ASSQEGGDQDTQY
13. ASSQEGTANTEVF

7.10 Abkürzungsverzeichnis

AiD	aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase
APC	Antigen-präsentierenden-Zelle
ARM-PCR	Amplikon-rettende multiplex PCR
BCL-6	B-Zell-Lymphom 6
BSA	Boviner Serumalbumin-Standard
C	Konstant
C3	Komplementfaktor C3
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CDR	<i>complementarity determining regions</i>
CMP	Knorpelmatrixproteindomäne
COL	Kollagen
Ct	<i>cycle threshold</i>
CXCR	C X C Motif Chemokin Rezeptor
D	Divers
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zellen
DEJ	Dermalen epidermalen Junctionszone
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>acid</i>)
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FN	Fibronectin
FoxP3	Forkhead box P3
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA3	Transkriptionsfaktor der GATA-Familie
GC	Keimzentrum (engl. <i>Germinal centre</i>)
GR-1	Granulocyte-1
GST	Glutathion S-Transferase
HCL	Salzsäure

HE	Hämatoxylin-Eosin
HT1	Hybridisierungspuffer
ICOS	Inducible costimulator
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IVM	intravitale Mikroskopie
J	Verbindende
Ki-67	Proliferationsmarker (Kiel-67)
mCOL	murines Kollagen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MLN51	Metastatic lymph node 51
NaOH	Natronlauge
NC	Nicht kollagen
NGS	<i>Next-generation-sequencing</i>
NTC	<i>No template control</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>Phosphate buffered saline</i>)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>)
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>acid</i>)
SD	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>)
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
Sybr	Cyanin-Farbstoff
Taq	Thermus / Thermophilus aquaticus
Tbet	<i>T-box expressed in T cells</i>
TBS Tween	Tris-buffered saline and tween
TE	Tris-EDTA

Tfh-Zelle	Follikuläre T-Helferzelle
Th	T-Helferzelle
TM	Titermax
TZR	T-Zell-Rezeptor
TZR β	T- Zellrezeptor- β -Kette
TZZ	T-Zell-Zone
V	Variabel
vWFA2	<i>von-Willebrand-factor-A-like-domaine-2</i>

7.11 Abbildungsverzeichnis

1.1	Plasmazellen Keimzentrumsreaktionen: Tfh Zellen helfen bei der Entstehung von hochaffinen antikörperbildenden Plasmazellen	8
1.2	Somatische Rekombination der Gene für die β -Kette des murinen T-Zell-Rezeptors	11
1.3	Differenzierung einiger T-Helferzellen-Subpopulationen	14
1.4	Kollagen VII verankert die dermalen Kollagene in der Basalmembran	18
1.5	Schematischer Aufbau von Kollagen VII und Peptide zur Immunisierung	19
2.1	Diskontinuierliche und denaturierte Polyacrylamid- Gelelektrophorese des rekombinant hergestellten und für die Immunisierung benutzten vWFA2	24
2.2	Isolierung der Keimzentren durch Lasermikrodissektion	29
3.1	Aufbau des Experimentes mit Auftreten von Symptomen der EBA	43
3.2	Entzündungsreaktion, hervorgerufen durch Zufügen von Kratzerosion	44
3.3	Ablagerung von Autoantikörpern und Aktivierung des Komplementsystems in der Versuchsgruppe	45
3.4	Quantitative Echtzeit PCR der Lymphknoten zeigen Unterschiede der Tfh- und B-Lymphozyten-Aktivität	47
3.5	Es kommt in beiden Gruppen zur Bildung von Keimzentren	49
3.6	Anzahl an Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen für beide Gruppen gleich	51
3.7	Median und maximal Werte der relativen Frequenzen der Tfh-Lymphozyten- β -Rezeptoren streuen in beiden Gruppen sehr, aber keinen signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen	52
3.8	Spezifische Analyse des Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Repertoires ergibt keine Änderung in der CDR3-Länge, erstaunliche Unterschiede in der Benutzung der V-Segment und kleiner Unterschied in der Benutzung der J-Segmente	54
3.9	Größere Übereinstimmung und Akkumulation der Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen unter Autoimmunbedingungen	57
3.10	Übereinstimmende Klonotypen benutzten hauptsächlich das V2- Gen-Segment bei EBA	58
3.11	Starke Übereinstimmung und Akkumulation der Tfh-Lymphozytenrezeptor- β -Klonotypen des rechten und linken poplitealen Lymphknotens bei Autoimmunität	60

7.12 Tabellenverzeichnis

2.1	Zyklische Einstellung der quantitativen Echtzeit PCR bei Taq-Man:	32
2.2	Zyklische Einstellung der quantitativen Echtzeit PCR bei Sybr-Green:	32
2.3	zyklische Einstellungen der Amplikon-rettende multiplex PCR	34
2.4	Zyklische Einstellungen der Amplikon-rettende multiplex PCR zur Amplifikation	35
2.5	Zyklische Einstellungen der PCR zur Quantifizierung der cDNA-Menge	37
7.1	Verwendete Chemikalien und Kits	86
7.2	Verwendete Lösungen und Puffer	88
7.3	Verwendete Verbrauchsmaterialien	89
7.4	Verwendete Geräte und Instrumente	90
7.5	Verwendete Software	92
7.6	Verwendete Antikörper	93
7.7	Verwendete Primer	94
7.8	Zusammenfassung der T-Lymphozyten-Rezeptor- β -Klonotypen	96

7.13 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meiner Betreuerin PD Dr. rer. nat. Kathrin Kalies für ihre tolle und hilfreiche Unterstützung bedanken. Du hattest stets ein offenes Ohr für Fragen und hast mir hilf- und lehrreich bei allen Problemen zur Seite gestanden. Vielen Dank für die Unterstützung und die tollen neuen Erfahrungen.

Außerdem möchte ich dem Institut für Anatomie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Jürgen Westermann danken, welches mir die Möglichkeit gab, meine medizinische Doktorarbeit über dieses spannende Projekt zu schreiben und die Laborausstattung zur Verfügung stellte. Ein weiteres Dankeschön geht an meine GRK Mentoren Prof. Dr. med. Ralf Ludwig und Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Manz, die mit vielen kritischen Fragen und Anmerkungen in den GRK Jour fixes mein Projekt vorantrieben.

Ein großes Dank geht außerdem an die Postdocs und Doktoranden in der Anatomie für die Hilfe und Unterstützung während der Zeit im Labor. Insbesondere danken möchte ich dabei Dr. rer. physiol. Cornelia Tune, Dr. rer. nat. Andrea Schampel, Rebecca Reumann und Lisa-Kristin Schierloh. Mit Euch verging die Arbeit im Labor wie im Flug und es hat mir eine Menge Spaß gemacht.

Ganz besonders möchte ich dabei Dr. rer. nat. Markus Niebuhr danken. Du hattest immer eine offene Tür für mich und hast mich geduldig in das Projekt eingearbeitet. Ich habe unglaublich viel von Dir lernen können. Und auch nach deinem PhD standst du mir mit Rat und Tat zur Seite. Vielen Dank dafür.

Des Weiteren möchte ich den Mitarbeitern in der Anatomie danken. Besonders hervorheben möchte ich dabei Lidija Gutjahr, Petra Lau, Daniela Rieck und René Pagel, ohne eure geduldige Anleitung in den ganzen Labortätigkeiten und eure technischen Fähigkeiten wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich während meines Studiums und der Zeit des Schreibens dieser Arbeit immer unterstützt und motiviert haben. Ich danke Euch für eure Geduld und eure aufbauenden Worte.

