

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktorin: Prof. Dr. med. I. Moll

**In vitro-Untersuchungen über Einflußfaktoren der Blasenbildung beim
bullösen Pemphigoid**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Martina-Elisabeth Spehlmann

aus Hamburg

Hamburg, 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 19. Mai 2004

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r: Prof. Dr. P. von den Driesch

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. K. Neuber

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. V. Steinkraus

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Bullöses Pemphigoid: Stand des Wissens	8
1.1.1 Definition	8
1.1.2 Epidemiologie	8
1.1.3 Pathophysiologie	9
1.1.4 Klinik	11
1.1.5 Allgemeinsymptome und Organbefall	12
1.1.6 Verlauf	12
1.1.7 Histologie	12
1.1.8 Zytologie des Blasengrundausrichs	13
1.1.9 Immunologie	13
1.1.10 Therapie	14
1.2 Für die Blasenbildung verantwortliche Zellsysteme und Entzündungsproteine	14
1.2.1 Polymorphkernige Granulozyten	14
1.2.1.1 Grundlagen	14
1.2.1.2 Aufbau	15
1.2.1.3 Aufgaben und Funktion	16
1.2.2 Das Komplementsystem	17
1.2.2.1 Komplementaktivierung	17
1.2.2.2 Lytische Terminalsequenz	18
1.2.2.3 Biologische Effekte von Komplementfaktoren: Inflammatorische und immunologische Wirkungen	19
1.2.3 Membranrezeptoren	20

1.2.3.1	Komplementrezeptoren	20
1.2.3.2	Adhäsionsmoleküle	21
1.2.3.3	Integrine	22
1.2.3.4	Die Leukozyten(β 2-)Integrine	23
1.2.3.4.1	LFA-1 (CD11a/CD18)	24
1.2.3.4.2	Mac-1 (CD11b/CD18)	25
1.2.3.4.3	gp150/95 (CD11c/CD18)	26
1.2.3.5	Antikörper-Rezeptoren	27
1.2.4	Zytokine	28
1.2.4.1	TNF- α	28
1.2.4.2	PAF	29
1.3	Mycophenolat Mofetil	30
1.3.1	Entwicklung und Pharmakodynamik	30
1.3.2	Pharmakokinetik	32
1.3.3	Dosierung	32
1.3.4	Indikationen	32
1.4	Cyclosporin A	32
1.4.1	Entwicklung	32
1.4.2	Pharmakodynamik	33
1.4.3	Pharmakokinetik	33
1.4.4	Indikationen	33
1.5	Fragestellung	35
2.	Material und Methoden	36
2.1	Biopsien	36
2.2	Isolierung der Granulozyten	36

2.2.1 Isolierung mittels Histopaque	36
2.2.2 Isolierung mittels Dextran	37
2.3 Vorbehandlung der Hautschnitte	38
2.3.1 Inkubation der Kryostatschnitte mit Serum von Patienten mit bullösem Pemphigoid	38
2.3.2 Inkubation der Kryostatschnitte mit Serum von gesunden Probanden als Kontrollgruppe	39
2.4 Adhäsionsassay	39
2.4.1 Aktivierung der Granulozyten und Inkubation der Hautschnitte	39
2.4.1.1 Aktivierung mit TNF- α	39
2.4.1.2 Aktivierung mit PAF	39
2.4.2 Färbung	39
2.4.3 Auszählung und Auswertung	40
2.5 Änderung der experimentellen Bedingungen des Adhäsionsassays	40
2.5.1 Blockierung	40
2.5.2 Inkubation der Kryostatschnitte mit IgG-depletiertem BP-Serum	40
2.5.3 Adhäsion der Granulozyten in Anwesenheit der Komplementfaktoren C3, C4 und C5	41
2.5.4 Vorbehandlung der Granulozyten mit Mycophenolat Mofetil	42
2.5.5 Inkubation der Granulozyten mit Cyclosporin A	42
2.5.6 Statistische Analysen	42
3. Ergebnisse	43
3.1 Einfluß des BP-Serums auf die Adhäsion neutrophiler Granulozyten an die epidermale Basalmembran	43

3.2 Einfluß der Zytokinstimulation auf die Adhäsionsfähigkeit neutrophiler Granulozyten	44
3.3 Einfluß von CD11b auf das Bindungsverhalten der Granulozyten im Adhäsionsassay	45
3.4 Der Einfluß von IgG im Granulozytenadhäsionsassay	47
3.5 Effekte von Komplementfaktor C3 im Adhäsionsassay	48
3.6 Effekte von Komplementfaktor C4 im Adhäsionsassay	49
3.7 Effekte von Komplementfaktor C5 im Adhäsionsassay	50
3.8 Anwendung des Medikaments Mycophenolat Mofetil im Granulozytenadhäsionsassay	51
3.9 Anwendung des Medikaments Cyclosporin A im Granulozytenadhäsionsassay	53
3.10 Blasenbildung an den Hautschnitten	54
4. Diskussion	56
4.1 Methoden	56
4.1.1 Adhäsionsassay	56
4.1.2 Granulozytenisolierung	56
4.1.3 Aktivierung der Granulozyten durch Zytokine	57
4.1.4 Die in vitro-Blasenbildung analog zum bullösen Pemphigoid	58
4.1.5 Blockierung des Adhäsionsprozesses durch CD11b-Antikörper	62
4.1.6 Adhäsionsversuche mit IgG-depletiertem Serum	64
4.1.7 Effekte von Komplementfaktoren	65
4.2 Einfluß von Medikamenten auf das Adhäsionsassay	66
4.2.1 Experimentelle Mycophenolat Mofetil-Konzentrationen	66
4.2.2 Mycophenolat Mofetil im Granulozytenadhäsionsassay	67

4.2.3 Cyclosporin A im Granulozytenadhäsionsassay	68
5. Zusammenfassung	70
6. Literaturverzeichnis	72
7. Abkürzungsverzeichnis	94
8. Danksagung	96
9. Lebenslauf	97
10. Erklärung	98

1. Einleitung

1.1 Bullöses Pemphigoid: Stand des Wissens

1.1.1 Definition

Das bullöse Pemphigoid zählt zu der Gruppe von bullösen Autoimmundermatosen, die durch eine Störung der Adhärenz zwischen Epidermis und Basalmembran charakterisiert sind (Korman, 1987). Klinisch imponiert diese Störung durch die Entstehung praller Blasen auf normaler oder entzündlich-geröteter Haut (Thivolet u. Barthelemy 1988).

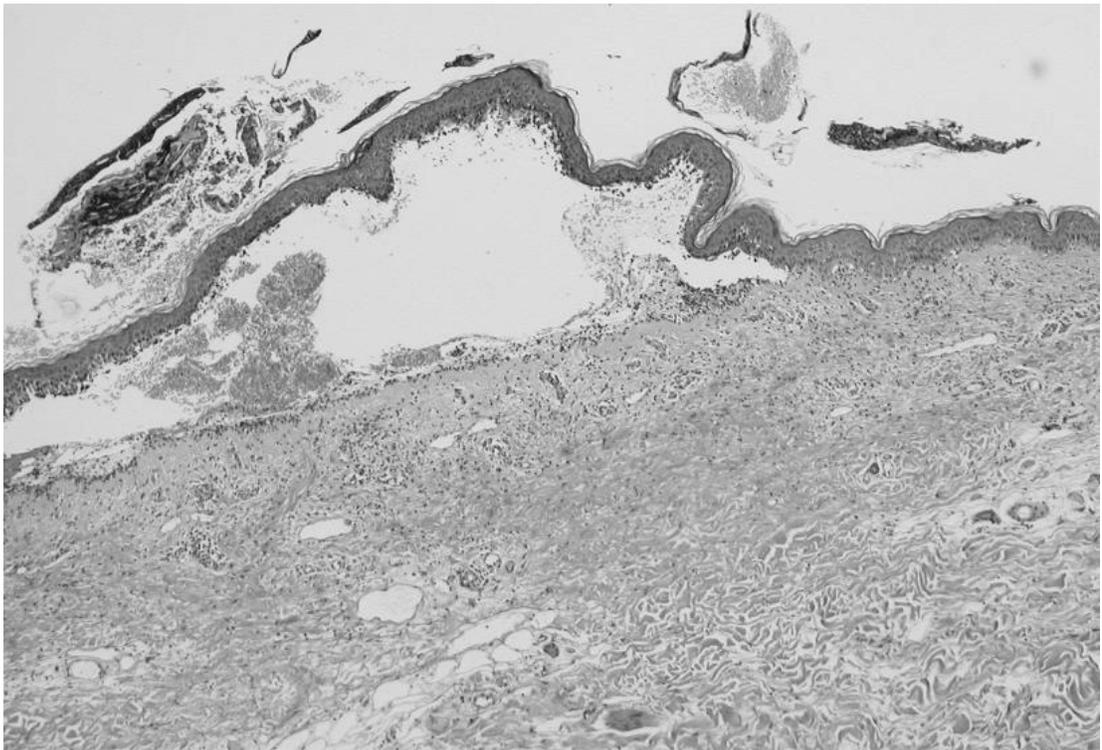


Abbildung 1.1: Histologisches Bild des bullösen Pemphigoids

1.1.2 Epidemiologie

Es finden sich keine ethnischen Prädispositionen, auch eine Assoziation mit HLA-Antigenen ist nicht gesichert. Die Erkrankung betrifft typischerweise Patienten ab dem 7. Lebensjahrzehnt mit Bevorzugung des männlichen Geschlechts. Sie kommt weltweit mit einer Inzidenz von ca. 1/100000 pro Jahr vor (Yaar u. Gilchrest 1987).

1.1.3 Pathophysiologie

Der wichtigste Mechanismus in der Pathogenese des bullösen Pemphigoids ist die Bildung von Antikörpern gegen Zielantigene der Basalmembran. Identifiziert wurden zwei Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts (BP 230 und BP 180). BP 230 stellt einen normalen Bestandteil der Basalmembran aller mehrschichtigen Plattenepithelien dar und wird von basalen Keratinozyten synthetisiert. Es befindet sich überwiegend intrazellulär an den zytoplasmatischen Plaques der Hemidesmosomen von Basalzellen und ist eng mit dem desmosomalen Adhäsionsprotein Desmoplakin I verwandt. Das Carboxylende bindet an die Keratinfilamente des Zytoplasmas, während der N-Terminus wahrscheinlich mit BP 180 und der $\beta 4$ -Kette des $\alpha 6\beta 4$ -Integrins interagiert.

BP180 ist ein transmembranöses Glykoprotein mit einer Typ-II-Orientierung, das heißt, der N-Terminus liegt intra- und der C-Terminus extrazellulär. Die Ektodomäne umfasst ca. 1000 Aminosäuren und besteht aus 15 Kollagen- und 16 Nichtkollagen-(NC)Domänen. Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen belegen, daß BP180 N-terminal mit hemidesmosomalen Plaques assoziiert ist. Mit dem zentralen Anteil überspannt das Protein die etwa 55-65nm breite Lamina lucida und reicht mit dem C-Terminus in die Lamina densa. Die NC16A-Domäne, die sich extrazellulär unmittelbar an die Zytoplasmamembran anschließt, stellt einen immundominanten Abschnitt des BP180 dar.

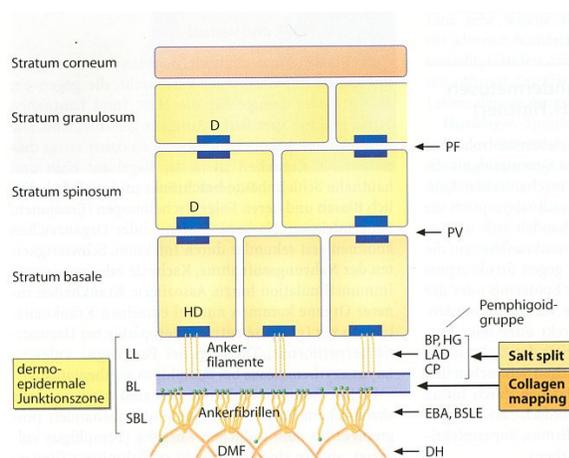


Abb. 1.2: Epidermis und dermo-epidermale Junctionszone. BP = Spaltebene beim bullösen Pemphigoid, LL = Lamina lucida, BL = Basallamina, SBL = Sub-Basallamina, AF = Ankerfilamente, DMF = dermale Mikrofibrillen, D = Desmosomen, HD = Hemidesmosomen (Fritsch PO 1998)

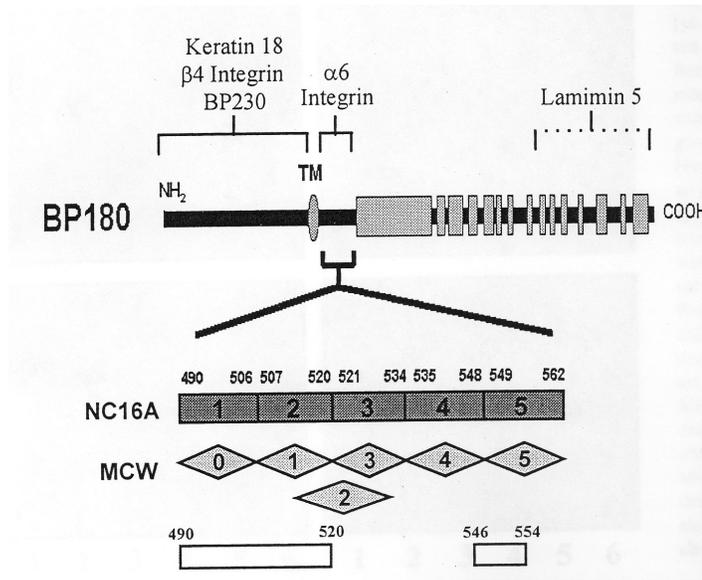


Abbildung 1.3: Die NC16A-Domäne des BP180 (Schmidt E et al. 2000)

In der Immunpräzipitation lassen sich in über 90 % der Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid Antikörper gegen BP 230 nachweisen. In 50 % sind Antikörper gegen BP 180 vorhanden. Die Mehrzahl der Seren von BP-Patienten reagiert sowohl mit BP 180, als auch mit BP 230. Allerdings ist bei einem Teil der Patienten die Reaktivität der Seren entweder auf BP230 oder auf BP 180 limitiert. Es gibt Hinweise darauf, daß die Autoantikörper gegen Komponenten des hemidesmosomalen Ankers im Zusammenwirken mit Neutrophilen, aber nicht notwendigerweise mit Komplement, für die dermal-epidermale Trennung verantwortlich sind (Sitaru C et al. 2002; Georgi M et al. 2001).

Das bullöse Pemphigoid wird auch als paraneoplastisches Syndrom diskutiert, da bei etwa 16 bis 20% der Patienten in zeitlichem Zusammenhang mit dem Ausbruch der Erkrankung maligne Tumore (vor allem Prostata-, Mamma- oder Bronchialkarzinom) gefunden werden können. Ob hier ein kausaler Zusammenhang oder lediglich eine Koinzidenz besteht, wird vor dem Hintergrund des hohen Lebensalters der Patienten und der damit verbundenen höheren Tumorzinzidenz kontrovers diskutiert.

Eine Induktion der Erkrankung ist auch durch Arzneimittel möglich, beschrieben wurde ein kausaler Zusammenhang mit der Gabe von Salazosulfapyridin, Penizillin,

Furosemid und Diazepam. Ebenso wurde die Entstehung eines bullösen Pemphigoids nach lokaler Anwendung von 5-Fluorouracil, UV- sowie Röntgenbestrahlung beschrieben (Roucco u. Sacerdoti 1991).

Ferner wird eine Koexistenz des bullösen Pemphigoids mit anderen Hauterkrankungen vermutet, bei denen eine Autoimmunpathogenese diskutiert wird, beispielsweise mit Pemphigus vulgaris, Pemphigus foliaceus, Dermatitis herpetiformis, kutanem Lupus erythematoses, Lichen ruber planus und Psoriasis vulgaris (Wollina u. Roth 1987).

1.1.4 Klinik

Das bullöse Pemphigoid zeigt ein pleomorphes Bild aus disseminierten konfluierenden Erythemen, urtikariellen und multiformen Läsionen, sowie Blasen unterschiedlicher Größe. Die Bullae können sowohl auf makroskopisch normaler, als auch auf erythematöser Haut entstehen, sind prall mit seröser Flüssigkeit gefüllt und lassen sich nicht wegdrücken. Wegen der Dicke der Blasendecke, die aus der gesamten Epidermis besteht, sind sie sehr resistent gegen mechanischen Druck. Kommt es zur Eröffnung der Blase, breiten sich die entstandenen Erosionen nicht peripher aus, sondern heilen meist ohne Narbenbildung ab. Das direkte und indirekte Nikolski-Zeichen ist negativ, daß heißt, die Blasen lassen sich weder durch seitlichen Schiebedruck auslösen (Nikolski I), noch erweisen sie sich unter Spateldruck als verschieblich (Nikolski II). Alle Entwicklungsstadien hinsichtlich der Größe, des Füllungszustandes und des Schuppungsgrades sind nebeneinander zu beobachten. Die Prädilektionsstellen sind die sogenannten Intertrigines und die Beugeseiten der Extremitäten. Von den Patienten wird häufig intensiver Juckreiz angegeben. Der Pruritus geht dem Ausbruch des bullösen Pemphigoids als Prodrom voraus. Typische dermale Komplikationen stellen Pyodermien dar, nach deren Ausheilung postinflammatorische Hyperpigmentierungen häufig sind. Die Mundschleimhaut ist nur selten betroffen. Diese mukosalen Läsionen sind weniger ausgeprägt als bei anderen blasenbildenden Autoimmundermatosen und stellen nur selten den Grund für eine Beeinträchtigung der Nahrungsaufnahme dar (Korman 1998).

1.1.5 Allgemeinsymptome und Organbefall

Allgemeinsymptome wie Fieber und Müdigkeit sowie der Befall innerer Organe fehlen bei komplikationslosem Verlauf. Assoziationen mit zahlreichen internen Erkrankungen werden vermutet, doch scheint es sich eher um Koinzidenzen zu handeln. Statistisch belegt sind ein gemeinsames Auftreten mit Diabetes mellitus, Glomerulonephritis, chronischer Polyarthritits und Colitis ulcerosa (Thivolet u. Barthelemy 1988).

1.1.6 Verlauf

Das bullöse Pemphigoid entsteht meist spontan. Der Verlauf ist schubartig rezidivierend und zieht sich unbehandelt über Monate und Jahre hin, wobei eine spontane Ausheilung diskutiert wird. Liegt aber eine Beeinträchtigung des Allgemeinzustands vor und treten zusätzlich Komplikationen wie kutane Superinfektion, Pneumonien und relevante Nebenwirkungen einer Kortikoidtherapie (zum Beispiel hypertensive Krisen, Diabetes mellitus) auf, kommt das bullöse Pemphigoid als Todesursache durchaus in Frage.

1.1.7 Histologie

Im Randgebiet von Blasen sieht man kleinste Hohlräume zwischen Epidermis und Korium. Die Bulla selbst entsteht durch subepidermale Spaltbildung. Die Blasendecke entspricht der gesamten Epidermis, zunächst ohne degenerative Veränderungen. Ihr Inhalt setzt sich aus Serum, Fibrinprodukten und eosinophilen Granulozyten zusammen. Eine Vaskulitis mit Endothelschwellung findet sich speziell beim bullösen Pemphigoid des nichtentzündlichen Typs, korreliert zur Schwere der entzündlichen Veränderungen im Korium. Zusätzlich läßt sich eine Verdickung der Kapillarwände und ein perivaskuläres Infiltrat aus Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten mit geringer Leukozytoklasie und einer meist großen Zahl von eosinophilen Granulozyten nachweisen. Gelegentlich kann es in den Papillen zu umschriebenen Ansammlungen von Neutrophilen und Eosinophilen kommen, die an intrapapilläre Mikroabszesse bei Dermatitis herpetiformis erinnern. Die Blasen-generierende Spaltbildung ist elektronenmikroskopisch zwischen der äußeren Zellmembran von Basalzellen und der Lamina densa der Basalmembran

innerhalb der Lamina lucida, dem Ort der Autoimmunreaktion, lokalisiert (Haustein et al. 1980).

1.1.8 Zytologie des Blasengrundausrichs

Da es sich beim bullösen Pemphigoid definitionsgemäß nicht um akantolytische Blasen handelt, findet man keine Pemphiguszellen und auch der Tzank-Test (Nachweis von Epithelzellen im Blaseninhalt) ist folglich negativ.

1.1.9 Immunhistologie

Mittels direkter Immunfluoreszenz können im Blasenbereich, in den Randzonen und in gesunder Haut Niederschläge von Immunglobulinen und Komplementfaktoren im Bereich der Basalmembranzzone (innerhalb der Lamina lucida) nachgewiesen werden, die ein charakteristisches lineares Muster zeigen. Am häufigsten findet sich die Komplementkomponente C3 zusammen mit Immunglobulin G (IgG), zumeist der Subklassen IgG2 und IgG4, seltener IgA oder IgM. Es besteht jedoch keine Korrelation zwischen dem Immunglobulin-Titer im Blut und den Ablagerungen in der Haut und ebenfalls keine strikte Korrelation zwischen der Höhe der Antikörpertiter und der Krankheitsaktivität (Jordon u. Bushkell 1979). Nur selten, vor allem in frühen Krankheitsphasen, läßt sich gebundenes C1, C4 oder C3 ohne Immunglobulin G nachweisen.

Mittels der indirekten Immunfluoreszenz können im Serum bei etwa 70 bis 80% der Patienten zirkulierende Antikörper als Basalmembran-Antikörper (Pemphigoidantikörper) nachgewiesen werden, die in gleicher Weise wie die in vivo gebundenen Pemphigoidantikörper an die Basalmembranzzone mehrschichtiger Epithelien binden und ein lineares Fluoreszmuster erzeugen. Geeignete Antigensubstrate für die indirekte Immunfluoreszenz sind Ösophagus (vom Affen) oder gesunde menschliche Haut, in welcher durch Vorinkubation mit 1-molarer Kochsalzlösung eine Spaltbildung in der Lamina lucia induziert wird; hier lokalisieren sich die IgG-Präzipitate meist an der epidermalen Unterseite der künstlich entstandenen Hautspalte.

1.1.10 Therapie

Die Therapie der Wahl ist eine initiale hochdosierte Kortikosteroidgabe von 60 bis 100 mg Methylprednisolon pro Tag sowie die Applikation von einem Immunsuppressivum wie Azathioprin. Auf letzteres kann dann wegen des guten Ansprechens der Erkrankung nicht selten verzichtet werden.

1.2 Für die Blasenbildung verantwortliche Zellsysteme und Entzündungsproteine

1.2.1 Polymorphkernige Granulozyten

1.2.1.1 Grundlagen

Polymorphkernige Granulozyten werden im Knochenmark mit einer Rate von 8×10^7 pro Minute produziert und sind mit einer Lebensspanne von 2 bis 3 Tagen recht kurzlebig im Vergleich zu Monozyten und Makrophagen (Bauer-Sic 1965). Granulozyten stellen etwa 60 bis 70 % der gesamten normalen Blutleukozyten, sind aber auch im extravaskulären Kompartiment zu finden. Wie Monozyten können auch polymorphe Granulozyten an Endothelzellen adhären und aus dem Gefäß auswandern, ein Vorgang, der als Diapedese bezeichnet wird. Die Adhäsion wird durch Rezeptoren der Polymorphen und korrespondierenden Liganden an den Endothelzellen vermittelt (Palmbad 1984).

Obwohl diese Zellen keine Spezifität für Antigene aufweisen, spielen sie eine wichtige Rolle bei der akuten Entzündung in der Abwehr von Mikroorganismen, indem in Kooperation mit Komplement und anderen Entzündungsmediatoren die Erregerspezifität durch spezifische Antikörper vermittelt wird. Ihre Hauptaufgabe ist die Phagozytose (Odeberg et al. 1973). Die Bedeutung der Polymorphkernigen zeigt sich bei pathologisch erniedrigten Zellzahlen (Leukopenien) oder bei funktionellen Leukozytenstörungen infolge genetischer Defekte (Hiob Syndrom, progressiv septische Granulomatose, Lazy-Leukocyte-Syndrom), bei denen der Gefäßaustritt der Polymorphkernigen nach chemotaktischer Reizung gestört ist oder andere Funktionseinschränkungen eine effektive Kooperation innerhalb der Entzündungskaskade verhindern. Beide Störungen führen bei den betroffenen Individuen zu einer erhöhten Infektionsbereitschaft.

Entsprechend der Anfärbarkeit ihrer spezifischen Granula mit panoptischen Färbemethoden erfolgt eine Unterteilung in neutrophile (<90%), eosinophile (2-4%) und basophile (<1%) Granulozyten. Die neutrophilen Granulozyten sind die wichtigsten Funktionsträger des unspezifischen zellulären Abwehrsystems (Bremm u. König 1988).

1.2.1.2 Aufbau

Reife Granulozyten enthalten einen ihrem Namen entsprechend variabel gestalteten, gelappten Kern, bestehend aus zwei bis fünf untereinander verbundenen Segmenten und ein relativ gering anfärbares Zytoplasma. Mit einem Durchmesser von 10 - 20µm sind die im Blut zirkulierenden Granulozyten im Gegensatz zu anderen Entzündungszellen (Monozyten und Lymphozyten) bereits voll ausdifferenziert und funktionsfähig (Keller u. Zimmermann 1987).

Granulozyten enthalten unterschiedlich große Granula, die sich, entsprechend ihrem Gehalt an Enzymen und anderen Funktionsproteinen, morphologisch und funktionell unterscheiden:

In den primären (azurophilen) Granula, den Lysosomen, befinden sich Säurehydrolasen, Myeloperoxidase und Muraminidase (Lysozym) mit potentiell antibakteriellen und antifungiziden Eigenschaften und dienen überwiegend intrazellulären Abbauvorgängen.

Die sekundären (spezifischen) Granula sind zahlreicher als die primären Granula und enthalten zusätzlich zum Lysozym Lactoferrin, Vitamin B12-bindende Proteine und viele Glykoproteine. Sie enthalten auch die Komplementrezeptoren CD11b (CR3) und CD11c (CR4), sowie Rezeptoren für chemotaktische Faktoren wie fMLP. Sie stellen einen intrazellulären Speicher für diese Komponenten dar. Deren Mangel resultiert in einer verminderten Fähigkeit der Zellen, den jeweiligen Rezeptor an der Oberfläche zu präsentieren.

Die spezifischen Granula sind relativ leicht zu mobilisieren und verschmelzen mit der Plasmamembran schon während der Wanderung der Neutrophilen zum Ort der Entzündung. Damit verbunden ist die Sekretion von Faktoren, die aus intrazellulären Granula freigesetzt werden.

Die tertiären Granula enthalten unter anderem Gelatinase und verschmelzen vermutlich mit der Zelloberfläche als Antwort auf schwache Stimuli (Aoki et al. 1980).

1.2.1.3 Aufgaben und Funktion

Eine wichtige Aufgabe der Neutrophilen ist die Phagozytose von Erregern. Nach Adhärenz der Erreger an der Zellmembran stülpt sich diese ein und bildet die sogenannten Phagosomen, die dann mit den Lysosomen der Zellen zu den Phagolysosomen verschmelzen. Diese Phagolysosomen enthalten zahlreiche Enzyme, unter anderem Säurehydrolasen, Lactoferrin und Muraminidasen, mit deren Hilfe die Erreger attackiert und desintegriert werden. Zu den intrazellulären, bakteriziden Enzymen gehört auch die Myeloperoxidase, welche die Synthese von bakteriziden, freien Sauerstoffradikalen (OH^- und O_2^-) ermöglicht (Borregaard 1996). Die Bindung von Antikörpern an Komplementfaktoren an der Oberfläche der Bakterien führt zu einer erheblichen Forcierung der Phagozytose (Opsonierung). Die Interaktion zwischen Antikörpern und Komplement einerseits und der granulozytären Zellmembran andererseits, wird durch granulozytäre Fc- bzw. Komplementrezeptoren vermittelt. Dieser Prozeß wird auch als antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC, Antibody Dependent Cell Cytotoxicity) bezeichnet (Kapp u. Zeck-Kapp 1990). Ein additiver oder alternativer Mechanismus zur Erregerelimination besteht in der extrazellulären Sekretion granula-ständiger Enzyme via Degranulation. Granulozyten sind, neben der Abwehr von Infektionen, auch an der Pathogenese von nicht-infektiösen Entzündungsvorgängen beteiligt. Es besteht ein Zusammenhang zwischen ihrer Akkumulation am Ort der Entzündung, der Freisetzung von proteolytischen Enzymen, sowie reaktiven Sauerstoffmetaboliten (erzeugt mit Hilfe eines NADPH-Enzymkomplexes an der Plasmamembran) und den lokalen Reparaturvorgängen, bzw. dem Remodeling. Die Fokussierung von Granulozyten am Entzündungsort wird durch Endothel-Adhärenzvorgänge und chemotaktische Faktoren gesteuert. Nach Aktivierung der Granulozyten kommt es unter anderem zur Stimulation des Hexosemonophosphat-Shunts und der Freisetzung von Sauerstoffradikalen durch das membranassoziierte NADPH-Oxydasesystem (=“respiratory burst“). Darüber hinaus begünstigen die Granulozyten die Inaktivierung der Proteasehemmer im Serum und leisten damit der

gewebedestruierenden Wirkung der granulozytären Proteasen Vorschub. Die zytolytische Wirkung dieser Sauerstoffradikale wird im gesunden Organismus durch ein glutathionhaltiges Antioxydantiensystem und durch die Katalase in Balance gehalten (Antonioli u. Vannotti 1967).

Schließlich steuern die Neutrophilen im Entzündungsgebiet (in Kooperation mit den Endothelien) die Durchblutung und die Permeabilität, bilden plättchenaktivierende Substanzen, aktivieren das Komplementsystem und generieren sekundäre Entzündungsmediatoren wie Leukotriene und Prostaglandine (Mavrakos 1989).

Beispiele für eine nicht-infektiöse Schädigung des Gewebes sind die Gicht, rheumatoide Arthritis, Immunkomplexvaskulitis und Glomerulonephritis. Diese Prozesse sind auch an der Entstehung von Entzündungen im Gastrointestinaltrakt (chronisch entzündliche Darmerkrankungen), im Respirationstrakt (beim ARDS, Adult Respiratory Distress Syndrome) und im Myokard nach Infarzierung verantwortlich. Wie bereits oben erwähnt, sind eine Reihe dermatologischer Erkrankungen, wie auch das bullöse Pemphigoid, durch eine Infiltration von Neutrophilen in die Haut charakterisiert.

1.2.2 Das Komplementsystem

1.2.2.1 Komplementaktivierung

Um Zellen bzw. Mikroorganismen mit Hilfe von Antikörpern zu lysieren, ist die „komplementäre“ Wirkung des Serums notwendig. Verantwortlich für diese Eigenschaft des Serums sind eine Reihe von Proteasen, die als Komplement-Komponenten bezeichnet werden. Traditionell werden diese Proteine mit dem Großbuchstaben C, gefolgt von einer Zahl, bezeichnet. Die meisten Komplement-Proteine sind Zymogene, das heißt Pro-Enzyme, die erst nach proteolytischer Spaltung aktiv werden. Ihre Spaltprodukte werden mit einem zusätzlichen Kleinbuchstaben versehen (Wilson et al. 1976).

Eine zentrale Rolle spielt das C3-Protein, das im Plasma in einer Konzentration von 1g/l nachweisbar ist. Es gibt zwei unterschiedliche Wege der Komplement-Aktivierung; beide führen zur Bildung eines proteolytischen Komplexes, der als C5-Konvertase bezeichnet wird.

Das klassische Weg der Aktivierung ist Antikörper-abhängig: Aggregierte Immunglobuline, wie sie in Immunkomplexen vorkommen, haben eine hohe Affinität für den C1q-Teil des Mannan-bindenden C1-Proteins. Die C1q-Bindung bewirkt eine Konformationsänderung von C1 mit Aktivierung von C1r und C1s, welche das Serum-Protein C4 in C4a und C4b spalten. Das größere Fragment C4b bindet an das Komplement-Protein C2, welches ebenfalls von C1s in C2a und C2b gespalten wird. Das C2a-Fragment bleibt an C4b gebunden, es entsteht die C3-Konvertase C4b2a. Diese spaltet C3 in C3a und das reaktionsaktive C3b. Als Endprodukt der Aktivierung des klassischen Weges wird die C5-Konvertase C4b2a3b gebildet (Bruninga 1971). Kleine Mengen von C3 im Plasma werden kontinuierlich zu C3a und C3b hydrolysiert.

Bindet C3 an die Oberfläche eines Mikroorganismus, kann der alternative Weg der Komplementaktivierung ausgelöst werden: Die Plasmafaktoren Faktor B und Faktor D bewirken durch Reaktion mit C3b die Spaltung des Faktors B in Ba und Bb. Faktor Bb bildet zusammen mit C3b den Komplex C3bBb, der ebenfalls eine C3-Konvertase darstellt. Der C3bBb Komplex wird durch Bindung von Properdin stabilisiert. Dieser stabile Komplex fördert die weitere, vollständige Spaltung von C3 (Amplifizierung). C3bBb bindet weitere C3b-Fragmente, es entsteht die C5-Konvertase des alternativen Weges C3Bb3b (Martynova u. Gollosava 1989).

1.2.2.2 Lytische Terminalsequenz

Als Endprodukte der klassischen und alternativen Komplementaktivierungswege werden zwei proteolytische C5-Konvertasen gebildet. Bei beiden stellt C3b die Bindungsstelle für das Serumprotein C5 dar, das wiederum in 5a und b gespalten wird. C5b ist schließlich in der Lage, die Komplementproteine C6 und C7 zu binden. Der trimolekulare Komplex C5b66 ist hydrophob und verankert sich in der Lipid-Doppelschicht der Zellmembran. Danach funktionieren die Komplementproteine C8 und C9 und es entsteht der C5b6789- oder C5b-C9-Komplex. C9 bildet einen polymeren Komplex aus bis zu 14 C9-monomeren Molekülen. Dieser gesamte Komplex wird als Membranangriffskomplex (MAK) bezeichnet und induziert eine Porenbildung in der attackierten Zellmembran (Frank 1989).

Körperzellen verfügen über einen Schutzmechanismus, der sie vor Lyse durch MAK schützt und der durch Oberflächenproteine vermittelt wird. CD59 beispielsweise ist an der Zellmembran über einen sogenannten Glykophospholipidanker (GPI) gebunden: GPI-verankerte Moleküle sind in der lipidhaltigen Zellmembran löslich und haben daher eine ausgeprägte laterale Mobilität. CD59 inhibiert die Insertion und Polymerisation von C9 (Aleksandrovskii 1988). Eine gestörte Funktion von GPI-verankerten Proteinen kann zu einer Überempfindlichkeit der Erythrozyten hinsichtlich einer Lyse durch autologes Komplement führen (zum Beispiel bei der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH)).

1.2.2.3 Biologische Effekte von Komplementfaktoren: Inflammatorische und immunologische Wirkungen

Aus der Spaltung von C3 und C5 resultieren die zwei kleinen Fragmente C3a und C5a, die Anaphylatoxine. Über Rezeptoren vermitteln sie eine Kontraktion der glatten Muskulatur, eine erhöhte Permeabilität der Gefäße, eine Degranulation von Basophilen und Mastzellen sowie die Chemotaxis und Aktivierung der Granulozyten mit Freisetzung von proteolytischen Enzymen und freien Radikalen (Bruninga 1971).

Die Beladung von Mikroorganismen oder humanen zellulären Strukturen mit Komplement führt zu einer verstärkten Phagozytose der Mikroorganismen und Sekretion funktioneller Proteine (Bruninga 1971; Loos 1985). Komplementprodukt-tragende Immunkomplexe werden effizient aus der Zirkulation entfernt, insbesondere via Phagozytose und Komplement-Rezeptor-tragenden Zellen. Hierdurch wird verhindert, daß sich ein krankheitsinduzierender Überschuß an Immunkomplexen bildet (Morel et al. 1977).

Beim bullösen Pemphigoid findet man in der Immunfluoreszenz Ablagerungen von C3 und C4 entlang der Basalmembran, und zwar auch bei Patienten mit aktiver Krankheit aber ohne zirkulierende Antikörper. Die meisten Seren von Erkrankten beinhalten aber Basalmembran-Antikörper, die möglicherweise das Komplementsystem an der dermo-epidermalen Junctionszone aktivieren können. Dies wurde in in vitro-Versuchen experimentell nachgestellt (Jordon 1969; Sams u. Schur 1973). Die Bindung von Komplementfaktoren an die Fc-Region von Immunglobulinen ist ein weiterer Kofaktor zur Aktivierung des Komplementsystems. Die Bildung solcher Immunkomplexe vermittelt ebenfalls eine

Aktivierung der Phagozytose und die Freisetzung lysierender Enzyme. Die Kopräsenz von Basalmembran-Antikörpern und Komplement könnte eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Blasenbildung spielen.

1.2.3 Membranrezeptoren

Essentiell für die Funktionen und diversen Interaktionen von Granulozyten mit anderen Zellen sind spezifische Oberflächenrezeptoren, welche nachfolgend klassifiziert dargestellt werden.

1.2.3.1 Komplementrezeptoren

Der CD35 (CR1) Rezeptor der Neutrophilen bindet an die Komplementspaltprodukte C3b und C4b.

Die Rezeptoren CR3 (CD18/11b) und CR4 (CD18/11c) gehören zur Gruppe der Integrine. Das Komplement-inhibierende C3-Spaltprodukt iC3b benötigt für seine Funktion eine Bindung an CR3 oder CR4.

Diese Rezeptoren vermitteln eine Phagozytose oder Ausschüttung von lytischen Enzymen, indem sie zuerst an die opsonierten Strukturen binden, dann deren Phagozytose induzieren und ihre Granula mit der Plasmamembran fusionieren. Nicht-aktivierte Neutrophile binden nur in geringem Prozentsatz an C3b. Nach einer Stimulation durch TNF- α , IL-8, PAF oder fMLP (Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin) werden die bindenden Komponenten von CR3- und CR4-Rezeptoren vermehrt exprimiert. Ein solcher Effekt wurde für CR1 bisher noch nicht beschrieben (Rosales u. Brown 1992).

Der C1q-Rezeptor/C1q-bindendes-Protein kann durch die C1q-Bindung eine chemotaktische Antwort der Neutrophilen provozieren (Leigh et al. 1989). Bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes wurde demonstriert, daß C1q-Rezeptor-Antikörper die Funktion der Neutrophilen beeinträchtigt (von den Berg et al. 1998).

Erst kürzlich wurde ein Rezeptor für das lösliche C3a auf Neutrophilen gefunden. Seine Funktion ist jedoch bisher noch nicht näher untersucht (Martin et al. 1997).

Des Weiteren wurde ein C5a-Rezeptor beschrieben, welcher bei Neutrophilen eine intrazelluläre Calcium-Mobilisation, eine vermehrte Expression von CD11b und CD18, eine Peroxid-Produktion, eine Freisetzung lysosomaler Enzyme und chemotaktische Aktivitäten fördert. Die durch C5a mediierte Stimulation von Neutrophilen beim bullösen Pemphigoid ließ sich in experimentellen Modellen von Immunkomplex-vermittelten Zellschäden und in einem passiven Transfermodell nachweisen (Hopken et al 1997; Liu et al 1997). Aktuell werden neue C5a-Antagonisten entwickelt und klinisch getestet (Pellas et al 1998).

1.2.3.2 Adhäsionsmoleküle

Die bei Immunreaktionen entstehenden Zell-Zell-Interaktionen werden durch Oberflächenstrukturen vermittelt. Das Immunsystem gewährleistet diese Funktion einerseits durch die antigenspezifischen Rezeptoren der Lymphozyten und andererseits durch Epitope auf der Zelloberfläche von Leukozyten, unter anderem MHC-kodierten Molekülen, sowie Fc- und Komplementrezeptoren (Arnaout 1990).

In den letzten Jahren wurde bekannt, daß zusätzlich zu diesen Rezeptoren zahlreiche weitere Oberflächenstrukturen zur Interaktion der Zellen beitragen, nämlich die zellulären Adhäsionsmoleküle (CAMs). Diese sind Proteine (meist Glykoproteine), kommen auf den Zellmembranen nahezu aller Körperzellen vor und fungieren als Rezeptoren bzw. als Liganden. Sie ermöglichen die Kommunikation der Zellen untereinander (Cellular Cross Talk) und die Interaktionen mit Proteinen der extrazellulären Matrix (Allen et al. 1991).

Der aus der selektiven Bindung von Zellen an spezifische Liganden resultierende Signalaustausch beeinflusst biologische Vorgänge wie Migration, Fixierung, Differenzierung und Aktivierung von Zellen. Wichtige Vorgänge wie Embryogenese, Gewebsaufbau, Wachstum und Regeneration werden ebenso durch Adhäsionsmoleküle vermittelt, wie die Entstehung und Ausbreitung von benignen und malignen Tumoren (Allen et al. 1991; Springer 1990).

Auch der Ablauf von Entzündungsreaktionen wird durch zelluläre Kommunikation beeinflusst, da die Adhärenz, Extravasation und Immigration der Leukozyten einerseits und die direkte Interaktion von Immunzellen untereinander andererseits, von der Mediierung durch Adhäsion abhängt (Larson u. Springer 1990; Osborn

1990; Springer 1990; Stoolman 1989; Yednock u. Rosen 1989). Wichtig in diesem Zusammenhang erscheint, daß die Immigration von Immunzellen in bestimmte Organe nicht spontan erfolgt, sondern über CAMs gesteuert wird (Stoolman 1989; Yednock u. Rosen 1989).

Der durch die Adhäsionsmoleküle bewirkte Zell-Zell-Kontakt löst eine Vielzahl von Reaktionen aus: Intrazellulär werden Botenstoffe aktiviert, welche eine Genexpression für bestimmte Proteine induzieren und so zur Umgestaltung des Zytoskeletts beitragen können. Diese Veränderungen des Zytoskeletts sind wichtig bei Vorgängen wie z.B. der Exozytose, Clusterbildung von Oberflächenproteinen im Kontaktbereich oder der Zellmotilität (Katz et al. 1991).

Erwähnenswert ist weiterhin das zeitlich begrenzte Vorkommen von Adhäsionsmolekülen auf Zellmembranen, bei gleichzeitiger intrazellulärer Bevorratung der Proteine in Vesikeln. Eine effektive und schnelle Hochregulation dieser Moleküle auf der Zelloberfläche kann so durch ein externes Signal kurzfristig initiiert werden (Springer 1990).

Die verschiedenen Typen von Adhäsionsmolekülen unterscheiden sich in ihrem molekularen Aufbau und ihrem Bindungsverhalten. Eine Einteilung ist aufgrund von Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz möglich.

Wegen ihrer Bedeutung für die hier beschriebenen Probleme sollen an dieser Stelle die Integrine und die Superimmunglobuline besprochen werden.

1.2.3.3 Integrine

Jedes Mitglied aus dieser großen Molekülgruppe besteht aus zwei nichtkovalent gebundenen Polypeptiden (α und β), welche beide die Membran überspannen (Allen 1991; Ina et al. 2002; Springer 1990). Die Unterfamilien bilden sich, indem die β -Ketten an mehrere α -Ketten binden (Hemler 1988). Bekannt sind derzeit 14 α - und 8 β -Ketten, welche in unterschiedlicher Kombination mindestens 22 verschiedene Integrine bilden können.

Die Funktion der Integrine ist nur in Anwesenheit von zweiwertigen Ionen (vor allem Magnesium oder Calcium) gewährleistet (Garcia-Gonzalez et al. 1990).

Der Ausdruck "Integrin" beschreibt treffend das Zusammenwirken der Membranrezeptoren: Sie "integrieren" die extrazelluläre Umgebung (extrazelluläre Matrix oder andere Zellen) mit dem intrazellulären Zytoskelett, das heißt, sie stellen einen Kontakt durch die Membran hindurch her (Kishimoto et al. 1989).

Integrine binden bevorzugt Liganden mit der Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparagin (RGD-Sequenz), die Bestandteile der Primärsequenz von Proteinen der extrazellulären Matrix darstellen. Auch die LDV-Sequenz (Leucin-Asparagin-Valin) ist eine häufige Bindungsstelle. Alle Mitglieder der Superimmunglobulinfamilie benutzen die LDV-Sequenz-ähnlichen Epitope als Rezeptor. Der Unterschied der LDV-Sequenzen zu den RGD-Abschnitten liegt in deren Sequenzvariabilität. Bisher wurden drei verschiedene Bindungsstellen für Liganden beschrieben: α - und β -Kette (wobei die erste Domäne der α -Untereinheit hervorzuheben ist), Kationen-bindende Abschnitte (α -Kette) und eine Aktivierung-Sequenz (β -Kette) (Arnaout 1990; Kishimoto et al. 1989; Stacker u. Springer 1991). Für die zwischen den beiden Liganden liegenden Abschnitte der β -Kette wurden Epitope für Antikörper mit regulierenden Eigenschaften nachgewiesen (Takada u. Puzon 1993). Die detaillierten Funktionen der Integrinaktivierung sind noch nicht vollständig geklärt.

1.2.3.4 Die Leukozyten (β 2-)Integrine

Diese sind an Zell-Zell-Interaktionen, insbesondere zwischen Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten beteiligt und relevant für den Ablauf und die Regulation von Entzündungen (Allen 1991; Springer 1990). Es sind drei Integrin-Prototypen beschrieben, das LFA-1 (Lymphocyte Function Antigen oder CD11a/CD18), das Mac-1 (Macrophage Antigen-1 oder CD11b/CD18) und das gp 150/95 (Glykoprotein mit einem Molekulargewicht der Untereinheiten von 150 und 95kDa oder CD11c/CD18). Molekularbiologisch bestehen die β 2-Integrine aus einer α -Kette (α L, α M, α X) und aus einer β -Kette. Beide Einheiten haben eine kurze zytoplasmatische, eine transmembranöse und eine große extrazelluläre Domäne (Kishimoto et al. 1987; Larson u. Springer 1990).

Die α -Untereinheiten heißen CD11a, b und c, die gemeinsame β -Untereinheit nennt sich CD18. Für die α -Kette liegt der Genlocus auf Chromosom 16, für die β -Kette auf Chromosom 21 (Marlin et al. 1986).

Die Funktion der Leukozytenintegrine wird bei Mutationen im Bereich der gemeinsamen $\beta 2$ -Einheit deutlich: Es resultiert das mit einer schweren Immunsuppression einhergehende, lebensbedrohliche Leukozyten-Adhäsions-Defizienz-Syndrom-1 (LAD-Syndrom) (Anderson u. Springer 1987). Den Neutrophilen dieser Patienten fehlt die Fähigkeit zur Orientierung und Migration als Antwort auf Entzündungsmediatoren und damit die Kompetenz, an Endothel zu binden und hierdurch das Gefäßsystem zu verlassen (Arnaout 1990).

1.2.3.4.1 LFA-1 (CD11a/CD18)

LFA-1 bindet an alle leukozytären Subpopulationen (Springer 1990; Springer et al. 1987). Nach Blockierung durch monoklonale Antikörper wird die leukozytäre Endotheladhäsion, die T-Zell-Proliferation, die Phorbol ester-induzierte homologe Adhäsion, sowie die Endothelbindung zytotoxischer Lymphozyten gehemmt (Davignon et al. 1981; Patarroylo et al. 1990; Sanchez-Madrid et al. 1982). Die Liganden von LFA-1 sind die ICAM-Glykoproteine (Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie). Die Aktivität des LFA-1 wird einerseits durch eine bis zu 24 Stunden dauernde de-novo-Synthese, andererseits durch eine rasche Konformationsänderung reguliert (Springer 1990). LFA-1 vermittelt sowohl antigenabhängige, als auch antigenunabhängige Kommunikation von Entzündungszellen (Springer 1990; Springer et al. 1987). In gesunder Haut finden sich stets LFA-1-positive Leukozyten (vor allem Lymphozyten und Monozyten) (Gruschwitz et al. 1992; Konter et al. 1989). Als Beweis für die Relevanz im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen kann aufgeführt werden, daß diese mit einer Zunahme LFA-1-positiver Zellen (neben Lymphozyten und Monozyten nun auch Granulozyten) einhergehen. Dies wurde an verschiedenen entzündlichen Erkrankungen wie Psoriasis, Lichen ruber, ekzematösen Läsionen oder akut vaskulitischen Reaktionen wie Erythema multiforme, Sweet-Syndrom und Erythema nodosum gezeigt (Chin et al. 1990; Griffiths et al. 1989; Gruschwitz et al. 1992; Konter et al. 1990; Lisby et al. 1989; Vejlsgaard et al. 1989). In einer Arbeit über die akzessorische Funktion von T-Zellen, die durch Langerhans-Zellen aktiviert werden, konnte eine LFA-1-Expression auf deren Zellmembran nachgewiesen werden (Simon et al. 1991).

1.2.3.4.2 Mac-1 (CD11b/CD18)

Die Bedeutung von Mac-1 wurde zuerst belegt durch die Fähigkeit von Mac-1-Antikörpern, die Bindung von Monozyten und Granulozyten an C3bi-beschichtete Erythrozyten zu inhibieren (Beller et al. 1982). Obwohl Mac-1 spezifisch an den Komplementrezeptor Typ 3 (CR3) bindet, kann es auch andere Zell-Zell-Interaktionen in Abwesenheit von C3bi delegieren. Weitere potentielle Liganden von Mac-1 sind Fibrinogen, Gerinnungsfaktor X, Elastase und ICAM-1. Auch Interaktionen mit Mikroorganismen wie *E. coli* sind beschrieben (Wright u. Jong 1986; Zhou et al. 1994). ICAM-2-Sequenzen wurden als Ligand zwar nachgewiesen, die Bedeutung dieser Bindung ist bisher jedoch ungewiß (Brown u. Lindberg 1996).

Die Folgen einer Mac-1-Bindung sind zytokin- oder leukotrienabhängige neutrophile Chemotaxis, Peroxidproduktion sowie Adhärenz an Epithelzellen und an Endothelien, wobei die endotheliale Interaktion durch einen Liganden an der dritten N-terminalen Domäne vermittelt wird (Diamond et al. 1991). Die korrespondierende Bindungsstelle an Mac-1 ist eine aus 200 Aminosäuren bestehende sogenannte I-Domäne (Inserted Domain) der α -Kette (Zhou et al. 1994). Neueren Erkenntnissen zufolge soll die Mac-1-Expression auch für die Bindung Neutrophiler an Keratinozyten der Haut verantwortlich sein, mit C3bi als korrespondierenden keratinozytengebundenen Liganden (Terui et al. 1995).

In gesunder Haut findet sich Mac-1 auf Langerhans-Zellen, dermalen Gewebsmakrophagen, Monozyten und Neutrophilen (Konter et al. 1989). Das Einwirken bestimmter Mediatoren wie Interleukine und Chemokine induziert bei den Neutrophilen eine Veränderung ihrer Oberflächeneigenschaften und die Formation von Zellaggregaten. In den letzten Jahren wurde herausgefunden, daß zwei verschiedene Formen der Aktivität von Mac-1 koexistieren: Entweder wird eine neutrophile Aggregation induziert, oder es resultiert ein quantitativer Anstieg der CD11b/CD18-Moleküle auf der Zelloberfläche (Buyon et al. 1990). Diese Ligandendichte korreliert jedoch nicht direkt mit der adhäsiven Funktion der Granulozyten (Philips et al. 1988; Vedder u. Harlan 1988). Diskutiert wird weiterhin eine qualitative Beeinflussung der Mac-1-Moleküle durch Aktivierung bestimmter Epitope. Eine qualitative Veränderung der β -Kette (CD18) durch Phosphorylierung mit Hilfe der Proteinkinase C wird für das sogenannte "arming" des CD11b/CD18-

Integrins bei der Initiierung der Neutrophilen-Aggregation verantwortlich gemacht (Merrill et al. 1990). Alternativ wird eine Phosphorylierung von Tyrosinresten des Mac-1-Moleküls auf neutrophilen Granulozyten, die mit chemotaktischen Faktoren wie fMLP, Leukotrien B4 oder TNF- α stimuliert werden, diskutiert (Naccache et al. 1994). Ein Beweis für diesen Mechanismus wurde durch Tyrosinkinase-Inhibitoren erbracht, die zu einer Hemmung der Expression und Funktion von CD11b/CD18 und damit zu einer verminderten Adhäsion an Endothelzellen führen. Das Substrat der Tyrosinkinase ist noch nicht identifiziert; nach bisherige Erkenntnissen handelt es sich jedoch um ein Protein von 60-70kDa. Ob dieser Vorgang zu einer Konformationsänderung des Integrins führt oder ob es zu einer forcierten Fusion der integrinhaltigen Granula mit der Plasmamembran kommt, ist ebenfalls unklar (Naccache et al. 1994).

Ein weiterer biologischer Effekt von Mac-1 stellt die Komplexbildung mit dem Immunglobulinrezeptor Fc γ RIII (CD16), CD63 und dem Urokinaserezeptor CD87 (uPAR) nach Stimulierung mit verschiedenen Zytokinen dar. Ein Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker verknüpft diese Strukturen mit der Plasmamembran. Erst eine Aktivierung von membranüberspannenden Proteinen wie dem CR3-Rezeptor (Mac-1) führt zu einer intrazellulären Signalinduktion. Die β 2-Integrin-vermittelte Adhäsion von Leukozyten an ICAM-1 auf Endothelzellen kann durch einen fehlenden Urokinaserezeptor CD87 blockiert werden, so daß von einer Beteiligung des uPAR an der Adhäsion im Sinne einer Regulierung der Integrin-Funktion ausgegangen wird (May et al. 1998; Simon et al. 1996).

1.2.3.4.3 gp150/95 (CD11c/CD18)

CD11c/CD18 findet sich vor allem auf Monozyten, in geringem Maße auch auf Neutrophilen. Antikörper gegen dieses Protein inhibieren die Endotheladhäsion sowie die chemotaktischen und phagozytierenden Eigenschaften von Makrophagen und Granulozyten. Ligand ist das Komplementspaltprodukt C3bi (Keizer et al. 1987; Lo et al. 1989).

In gesunder Haut exprimieren dermale Gewebsmakrophagen und ruhende Langerhans-Zellen ebenfalls gp 150/95 (De Panfilis et al. 1989; Weber-Matthiesen u. Sterry 1990). Bei kutan-vaskulären Reaktionen sind bis zu 70% aller infiltrierenden

Zellen positiv, was darauf schließen läßt, daß auch Granulozyten nach Aktivierung verstärkt gp 150/95 exprimieren können (Von den Driesch 1993).

Erwähnenswert ist ferner, daß die α -Untereinheiten von Mac-1 und gp150/95 eine 63%ige Identität ihrer Aminosäuresequenz aufweisen, jedoch nur 35% Übereinstimmung zu der α -Einheit von LFA-1 nachweisbar ist (Gruschwitz et al. 1992).

1.2.3.5 Antikörper-Rezeptoren

Mit Immunglobulin G-Antikörpern beladene Partikel können an die entsprechenden Fc-Rezeptoren binden, wobei das Immunglobulin in monomerer oder aggregierter Form vorkommen kann. Man unterscheidet drei Typen von Fc-Rezeptoren für IgG: Neutrophile exprimieren Fc γ RII (CD32) mit hoher Affinität für aggregiertes IgG, Fc γ RIII (CD16) mit niedriger Affinität für aggregiertes IgG und zusätzlich Fc γ I, ebenfalls mit niedriger Affinität für aggregiertes IgG. Fc γ RI (CD64) wird aber nur nach Stimulation mit INF- γ exprimiert und scheint an der Beseitigung von Immunkomplexen beteiligt zu sein (Voice u. Lachmann 1997).

Die Interaktion mit IgG-Fc-Rezeptoren führt eine Reihe biologischer Funktionen wie die Aktivierung des "respiratory burst", die "antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity", die Antikörper-abhängige Phagozytose sowie die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel TNF- α oder IFN- γ (Rosales u. Brown 1992). Alle Fc-Rezeptoren bewirken durch Aktivierung einer Tyrosinkinase der Src- und ZAP-70-Familien eine intrazelluläre Signalkaskade. Je nach Zelltyp, bzw. Fc-Rezeptortyp werden nachfolgend andere Enzyme aktiviert, wie die Phospholipase C γ 1, die Phosphatidylinositol-3-Kinase und die Mitogen-aktivierte Proteinkinase, wodurch ein intrazellulärer Calziumanstieg hervorgerufen wird (Sanchez-Mejorada u. Rosalez 1998). Der Fc γ III-Rezeptor kann bei Aktivierung des Komplementrezeptors in Gegenwart von Natriumionen die Neutrophilen aktivieren (Barabe et al. 1998). Bei myelodysplastischen Syndromen, welche oft mit neutrophilen Dermatosen und dem atopischen Ekzem in Verbindung gebracht werden, wurde eine veränderte Expression von IgG-Fc-Rezeptoren festgestellt (Isolauri et al. 1997; Ohsaka et al. 1997). Die Funktion des Fc- α -Rezeptors (CD89) wurde erst kürzlich in Zusammenhang gebracht mit der "antibody dependent

cytotoxicity“ (Launay et al. 1998). Auch von einer erfolgreichen therapeutischen Manipulation des Rezeptors wurde berichtet (Valerius et al. 1997).

1.2.4 Zytokine

Bei den Zytokinen handelt es sich um Protein-Mediatoren, die von den Zellen des Immunsystems gebildet werden und die dessen Differenzierung und Aktivierung steuern. Ihre Aufgabe ist die Signalübermittlung über kurze Distanz. Ihre Wirkung bezieht sich jeweils nur auf einen definierten Zweck, einen bestimmten Zeitpunkt und auf ein spezifisches Mikroenvironment. Die Zytokin-Sensibilität von Granulozyten ist schon seit langem bekannt. Die eigenständige Zytokinproduktion (wie zum Beispiel TNF- α , Il-6, Il-8) der Granulozyten wurde jedoch erst vor kurzem beschrieben. Die für Adhäsionsvorgänge in den hier vorliegenden Experimenten relevanten Zytokine sollen im Folgenden dargestellt werden.

1.2.4.1 TNF- α

TNF- α ist ein 17kDa großes Polypeptid aus 157 Aminosäuren, das aufgrund der Induktion von hämorrhagischen Nekrosen bei transplantierten Tumoren in Mäusen benannt wurde.

TNF- α spielt eine wichtige regulatorische Rolle bei Entzündungen, da es bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Entzündungskaskade vorwiegend von aktivierten Monozyten und Makrophagen allein oder zusammen mit Il-1 und Il-6 gebildet wird und so die Funktion der an der Entzündung beteiligten Immunzellen moduliert. TNF- α hat ein breites Wirkungsspektrum. Bei vielen inflammatorischen Prozessen konnte eine Beteiligung von TNF- α nachgewiesen werden, so zum Beispiel bei der Entstehung des septischen Schocks (Fehlregulation mit hohen TNF- α -Konzentrationen), der Kachexie (Hemmung der Lipoprotein-Lipase, und dadurch Störung der Fettspeicherung), der Immunantwort im Verlauf einer akuten Entzündung, der Hemmung von Tumorwachstum durch Apoptose (Bindung an Apoptoserezeptoren) und der Stimulation der Angiogenese (Larrick et al. 1987).

In Bezug auf Neutrophile führt TNF- α zu einer Steigerung der Phagozytose, Zytotoxizität, Produktion weiterer granulozytärer Zytokine und Expression von Adhäsionsmolekülen. Es wirkt dabei auf die Polymorphkernigen durch Bindung an

den p55-TNF-Rezeptor (55kDa) und p75-TNF-Rezeptor (75kDa). Als die entscheidende Bindungsstelle für die durch TNF- α hervorgerufene Entzündungsreaktion in der Haut wurde der p55-TNF-Rezeptor erklärt (Kondo u. Sauder 1997). Nach proteolytischer Spaltung der extrazellulären Regionen dieser Rezeptoren bilden sich lösliche TNF-bindende Proteine, das TNF-R55-Bindungsprotein und das TNF-R75-Bindungsprotein, ein Vorgang den man als Shedding (Abwerfen der Rezeptoren durch Abspaltung) bezeichnet. Das Shedding stellt ein mögliches gegenregulatorisches Signal dar. Im Falle der TNF- α -Wirkung auf Tumorzellen ließe sich ein möglicher Tumor-Escape-Mechanismus denken, da sich Tumorzellen durch Abwerfen ihres TNF-Rezeptors dem zytotoxischen Effekt von TNF- α entziehen können (Richter u. Zetterberg 1994). Des Weiteren ist TNF- α in der Lage, die Expression von Adhäsionsmolekülen wie des β 2-Integrins Mac-1 zu steigern und somit die Bindung an Endothelzellen oder Keratinozyten zu fördern. Durch monoklonale Antikörper gegen Mac-1 ist dieser Vorgang inhibierbar (Limb et al. 1991).

1.2.4.2 PAF

PAF (platelet activating factor) wurde 1972 als solcher identifiziert (Benveniste et al. 1972). Sieben Jahre später wurde seine Molekularstruktur (1-0-Alkyl-2-0-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine) analysiert (Demopoulos et al. 1979). Das komplexe Molekül wird von Leukozyten, aktivierten Endothelzellen, Fibroblasten in der Dermis und Keratinozyten der Epidermis synthetisiert und bindet an Neutrophile über einen spezifischen Membranrezeptor. Dieser Rezeptor gehört zur Gruppe der GTPase-bindenden Epitope, da die von ihm in Gang gesetzte Signaltransduktion über G-Proteine im Zellinneren moderiert wird. Weiterhin kommt es über die Phosphoinositolkaskade (Entstehung der Second Messenger IP3 (Inositoltriphosphat) und DAG (Diacylglycerol) zur Initiierung wichtiger Zellreaktionen mit Hilfe der Proteinkinase C und der Tyrosinkinase mit konsekutiver intrazellulären Calciummobilisation (Shimizu et al. 1992).

Bei Polymorphkernigen ruft PAF die Freisetzung lysosomaler Enzyme, Leukotriene, Granulaprodukte und Superoxidverbindungen hervor (Tjoelker et al. 1995). Auch die Autoaggregation sowie die Adhäsion an Endothelien wird gesteigert (Ingraham et al.

1982). Eine Neutro- und Thrombopenie wird durch in vivo-Injektionen von PAF verursacht, vermutlich durch Bildung intravaskulärer Aggregate (Camussi et al. 1981).

Die Adhäsion und Komplementbindung wird durch Expressionsinduktion der β 2-Integrine CD11b/CD18 und CD11c/CD18 mediiert, wobei dies möglicherweise durch Beförderung von Granula an die Zelloberfläche initiiert wird (Asako et al. 1992). Darüberhinaus wird angenommen, daß PAF an die Plasmamembran von Keratinozyten bindet, eine Vernetzung der Granulozytenrezeptoren protegiert und so die Granulozyten Calcium-vermittelt aktivieren kann (Katayama et al. 1994).

1.3 Mycophenolat Mofetil (MMF)

1.3.1 Entwicklung und Pharmakodynamik

Die Entwicklung von Mycophenolat Mofetil (MMF), ein fermentiertes Produkt mehrerer *Penicillium*-Spezies, ging aus dem Wunsch hervor, ein Medikament herzustellen, das selektiv die Proliferation von Lymphozyten hemmen konnte (Allison u. Eugui 1993). Dabei machte man sich zu Nutzen, daß die De-novo-Purinsynthese in menschlichen Lymphozyten über den intrazellulären Pool an Guanodin- und Adenosin-Nukleotiden reguliert wird. So nimmt die Aktivität der 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Synthetase (PRPP), die das Schlüsselenzym der Purin-Neusynthese darstellt, bei zunehmender Konzentration von AMP und ADP ab. Bei vermehrtem intrazellulären Anfall von Guanodin-Nukleotiden hingegen wird die Purin-Neusynthese stimuliert. Der Abbau von Adenosin-Nukleotiden erfolgt durch zwei Enzyme: Zum einen die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMP-DH), zum anderen die Adenosin-Desaminase. Kinder mit hereditärer Defizienz der Adenosin-Desaminase weisen einen selektiven Mangel an T- und B-Lymphozyten auf, während Kinder mit genetisch defizienter Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (Lesch-Nyhan-Syndrom) zerebrale Entwicklungsschäden, aber keinen Immundefekt entwickeln. Man schloß daraus, daß verschiedenartige Gewebs- und Zellsysteme unterschiedlich abhängig von der De-novo-Synthese bzw. dem Salvage Pathway zur Deckung ihres Bedarfs an Guanodin-Nukleotiden sind (Allison et al. 1975). Während die meisten Zellen beide Stoffwechselwege nutzen können, sind

neuronale Zellen auf den Wiederverwertungsstoffwechsel angewiesen. Lymphozyten dagegen nutzen ausschließlich die De-novo-Synthese von Purin-Nukleotiden.

MMF ist der Morpholinoethylester der Mycophenolsäure, welche die pharmakodynamisch eigentlich wirksame Substanz darstellt. Mycophenolsäure wirkt als kompetitiver, reversibler Hemmstoff der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase. Inosinmonophosphat (IMP) nimmt als Intermediärprodukt der Purin-Biosynthese eine zentrale Position ein und kann sowohl in Guanosinmonophosphat (GMP), als auch in Adenosinmonophosphat (AMP) konvertiert werden. Hemmung der IMP-Dehydrogenase führt in Lymphozyten bei gleichzeitigem Exzess von AMP und ADP zur Verminderung des intrazellulären Pools an GMP, GDP und GTP (Allison u. Eugui 1991). Guanosine und davon abgeleitete Desoxyguanosine sind essentiell für die Synthese von DNA und RNA und damit Voraussetzung für die Proliferationsfähigkeit von Zellen. Resultat der IMP-Dehydrogenase-Hemmung ist eine verminderte Bildung von Effektorzellen für T-Zell-vermittelte Funktionen und für die Produktion von Antikörpern durch B-Zellen. Gleichzeitig kommt es zu einem Downstream-Effekt auf T-Zell-abhängige Zytokine wie IL-2 und IL-4, die die klonale Expansion von antigenstimulierten Lymphozyten heraufregulieren, sowie eine Inhibition der Freisetzung von Interferon- γ , wodurch die Expression der MHC-Determinaten vermindert wird (Halloran 1996).

In vitro ist die antiproliferative Wirkung von Mycophenolsäure auf Fibroblasten und endotheliale Zellen, die mit Interleukin-1 α (oder rekombinantem β -Fibroblast-Growth-Factor) stimuliert wurden, weniger stark ausgeprägt als auf Lymphozyten (Eugui et al. 1991). Allerdings vermag Mycophenolsäure in Zellkultur das Wachstum von humanen glatten Muskelzellen zu unterdrücken.

Als weitere Konsequenz der Mycophenolsäure-Wirkung resultiert eine Inhibition der Übertragung von Mannose und Fukose auf Glykoproteine als Folge der intrazellulären Depletion von GTP (Allison et al. 1993; Laurent 1996). Glykoproteine sind Bestandteil vieler Adhäsionsmoleküle, die bei der Interaktion zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen bedeutsam sind. Besonders Very-Late-Antigen-(VLA)-4, das auf der Zelloberfläche von Lympho- und

Monozyten exprimiert wird, verliert bei reduzierter Glykosylierung die Affinität zu seinem Gefäßwandrezeptor VCAM (Laurent et al. 1996).

1.3.2 Pharmakokinetik

MMF hat eine orale Bioverfügbarkeit von 94% und wird schnell zur freien Mycophenolsäure hydrolysiert, die ihrerseits überwiegend als inaktives Glukuronid renal eliminiert wird (Bullingham et al. 1996; Bullingham et al. 1996; Fulton u. Markham 1996; Lee et al. 1990).

1.3.3 Dosierung

Je nach Krankheitsbild variiert die Dosierung. Bei Nierentransplantierten liegt die Empfehlung bei einer mittleren Tagesdosis von 2g pro Tag in Kombination mit Cyclosporin A und Glukokortikoiden (Luger 2001).

1.3.4 Indikationen

Die Hauptindikation ist die Prävention von Abstoßungsreaktionen bei Nierentransplantierten. Aber auch nach Transplantation anderer Allografts wie Herz, Leber, Pankreas und Lunge wird MMF erfolgreich eingesetzt. Bei speziellen immunologisch vermittelten Krankheiten, wie etwa M. Crohn oder C. ulcerosa findet MMF eine experimentelle Anwendung. Es wurde auch bereits zur Behandlung von Hautkrankheiten, wie etwa dem bullösen Pemphigoid, Psoriasis oder Allergien eingesetzt (Bohm et al. 1997; Neuber et al. 2000; Nousari et al. 1999).

1.4 Cyclosporin A

1.4.1 Entwicklung

Cyclosporin A (CyA) wurde 1970 von J.F. Borel in Basel aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* Gams isoliert. Es handelt sich um ein aus den Myzelien extrahiertes zyklisches Polypeptid (Undecapeptid) (Gupta et al. 1991). Seiner chemischen Struktur und seiner Herkunft aus Pilzen verdankt Cyclosporin seinen Namen.

1.4.2 Pharmakodynamik

CyA hemmt reversibel, dosisabhängig und selektiv, das heißt nicht generell zytotoxisch die aktivierten T-Helferzellen, weitaus weniger die T-Suppressorzellen- und B-Zellen (Eisen u. Ellis 1990). Dabei blockiert CyA sehr wirksam Interleukin 2 und zwar wahrscheinlich sowohl die Synthese (Transkription), als auch die Bindung am Rezeptor (Powles et al. 1990). Seine Wirkung auf weitere Interleukine, wie zum Beispiel IL-1, IL-3, IL-4, IL-5 und IL-6 ist möglicherweise für seine gleichzeitige antiinflammatorische Wirkung von Bedeutung (Baadsgaard et al. 1990).

Die Aufnahme von CyA in die Zellen und seine intrazelluläre Anreicherung wird durch ein ubiquitäres 21kD-Bindungsprotein vermittelt, das so genannte Cyclophillin, welches über eine Regulation der Genaktivität unter anderem die Synthese von IL-2 hemmt (Powles et al. 1990).

1.4.3 Pharmakokinetik

Die orale Bioverfügbarkeit liegt bei 34% (individueller Schwankungsbereich zwischen 20-50%). Deshalb ist bei der oralen Therapie eine fortlaufende Bestimmung der Talkonzentration im Gesamtblut oder Blutplasma notwendig (Holt et al. 1988; Kunzendorf et al. 1991). Die Elimination erfolgt weitgehend durch Metabolisierung und Ausscheidung über die Galle (Kahan 1989; Watkins 1990).

1.4.4 Indikationen

Der Anwendungsbereich erstreckt sich auf die Prophylaxe und Behandlung der Transplantatabstoßung nach allogener Organtransplantation und Knochenmarktransplantation einschließlich der Graft-Versus-Host-Erkrankung. Des weiteren werden diverse andere immunologisch vermittelte Krankheiten mit Cyclosporin A behandelt. Beispiele hierfür sind dermatologische Krankheiten wie zum Beispiel Psoriasis vulgaris oder bullöses Pemphigoid (Cooper et al. 1990; Curley u. Holden 1991; Schulze et al. 1990). Auch bei Erkrankung anderer Organsysteme, wie den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (insbesondere der Colitis ulcerosa), wird Cyclosporin erfolgreich eingesetzt.

Ein weiterer Indikationsbereich wurde für die Behandlung des toxischen Megacolons und des foudroyanten Pyoderma gangraenosum durch kontinuierlich intravenöse Cyclosporin A-Applikation erarbeitet.

1.5 Fragestellung

Im folgenden soll mit Hilfe eines Adhäsionsassays der Einfluß von Immunglobulin G, Komplementfaktor C3, C4, C5 und des Adhäsionsmoleküls CD11b hinsichtlich der Bindung von Granulozyten an Hautstrukturen als in vitro-Modell des bullösen Pemphigoids untersucht werden. Mit Hilfe dieses Adhäsionsassays soll ferner geprüft werden, in wieweit die Medikamente Mycophenolat Mofetil und Cyclosporin A die Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und epidermaler Zellen zu beeinflussen vermögen.

2. Material und Methoden

2.1 Biopsien

Bei 11 Patienten der Dermatologischen Universitätsklinik Hamburg wurden aus im Rahmen notwendiger operativer Eingriffe anfallender gesunder Randhaut postoperativ 3mm-Stanzbiopsien unterschiedlicher Lokalisationen (z.B. Rücken, Schulter, Arm, Oberschenkel) entnommen. Dies erfolgte nach eingehendem Aufklärungsgespräch und dokumentiertem Einverständnis. Die Biopsien wurden umgehend in flüssigem Stickstoff bei -70°C eingefroren und bei -80°C gelagert. Gefrierschnitte der Biopsien in $4\mu\text{m}$, $7\mu\text{m}$ und $8\mu\text{m}$ Dicke wurden mittels eines Kryostaten (Leica, Hamburg) angefertigt, die Schnitte paarweise auf einen silanisierten Objektträger aufgebracht und ohne Unterbrechung der Kühlkette bei -80°C eingefroren. Die Silanisierung der Objektträger erfolgte nach einem Standardprotokoll: Eine 5-minütige Entfettung in reinem Aceton wurde gefolgt von ebenfalls 5-minütiger Inkubation in einem Gemisch aus 250ml Aqua dest. und 5ml Silan (5-Aminopropyl-Triethoxysilane, Sigma Aldrich, Steinheim). Anschließend folgten jeweils 2 Waschungen für 5 min. in Aqua dest. und die Trocknung der Objektträger in einem Brutschrank für 24 h bei $50-60^{\circ}\text{C}$.

2.2 Isolierung der Granulozyten

Die Isolierung der Granulozyten erfolgte alternativ nach 2 verschiedenen Methoden: Isolierung mittels Histopaque oder Isolierung mittels Dextran.

2.2.1 Isolierung mittels Histopaque

Von gesunden Blutspendern wurde zunächst 10ml venöses Blut in EDTA-Röhrchen (S-Monovette, Sarstedt, Nümbrecht) entnommen. In einer Falcontube (50ml Polypropylene Conical Tube, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) wurden übereinander 15ml Histopaque 1119, 15ml Histopaque 1077 (Sigma Aldrich, Steinheim) und 10ml Blut gegeben und anschließend bei 1500 rot./min. 45 min. lang ohne Bremsschaltung bei 20°C zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus, Hannover). Nach dem Zentrifugieren wurde das Plasma mit dem Lymphzytensaum und den

Thrombozyten und das Histopaque 1077 zur Hälfte abgesaugt. Nach Pipettierung der folgenden Banden, bestehend aus der anderen Hälfte Histopaque 1077, den Granulozyten, wenigen Erythrozyten und dem Histopaque 1119 in einen neuen Falcontube, wurde dieser bis zur 30ml-Marke mit HBSS (Hanks Balanced Salts Solution, GIBCO, Karlsruhe) aufgefüllt. Bei diesem Präparationsschritt wurden die auf den Boden des Falcontubes sedimentierten Erythrozyten belassen, um die weitere Verarbeitung der Granulozyten nicht zu behindern. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt mit 2000 rot/min. bei 20°C für 10 min. mit Funktionsbremsung, wurde der Überstand bis zum roten Sediment (bestehend aus einem 1ml Gemisch aus Granulozyten und Erythrozyten) abgesaugt. Um die residuente Erythrozyten zu eliminieren, wurden diese mit Hilfe einer hypoosmolaren Lösung lysiert (9ml Aqua dest. für 1 min. der Granulozyten-/Erythrozyten-Suspension zugegeben). Danach erfolgte die Wiederherstellung einer isotonen Lösung durch Zugabe von 1ml einer 9%igen Kochsalzlösung. Erneut wurde der Falcontube bis zur 30ml-Marke mit HBSS aufgefüllt und 10 min. mit 2000 rot./min. bei 20°C zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand bis auf die sedimentierten Granulozyten abgesaugt und das Sediment in 1ml RPMI-1640-Medium (GIBCO, Karlsruhe) resuspendiert.

Um eine Konzentration von 6×10^6 Zellen einzustellen, wurden jeweils 10µl-Proben aus der 1ml-Zellsuspension entnommen und die Zelldichte mittels einer Neubauer-Zählkammer wiederholt ermittelt.

Der Anteil der neutrophilen Granulozyten an den isolierten Zellen beträgt bei Anwendung dieser Methode >95%. Der Trypan-Blau-Test ergibt eine Vitalität der Zellen von >96%.

2.2.2 Isolierung mittels Dextran

Um die Granulozyten mit Hilfe der Dextran-Sedimentationsmethode zu isolieren, wurde 20ml heparinisiertes Dextran T250 (Roth, Karlsruhe) in einem Verhältnis 10 Teile Blut zu 1 Teil Dextran versetzt. Danach wurde das Gemisch 45 min. bei 37°C belassen, so daß sich die Erythrozyten bis auf die Hälfte des Gesamtvolumens absetzen konnten. Der erythrozytenfreie Überstand wurde 30sec. bei $560 \times g$ zentrifugiert. Nach Abpipettierung des Superfugens wurden die im Serum

befindlichen Erythrozyten 3× in RPMI 1640-Medium gewaschen. Die Einstellung der benötigten Zellzahl von 6×10^6 erfolgte wiederum nach Resuspension der Granulozyten in 1ml RPMI.

Bei dieser Methode beträgt der Anteil der neutrophilen Granulozyten an den isolierten Zellen 92,3% (+/- 3,9%). Der Trypan-Blau-Test ergibt eine Vitalität der präparierten Zellen von > 96%.

2.3 Vorbehandlung der Hautschnitte

2.3.1 Inkubation der Kryostatschnitte mit Serum von Patienten mit bullösem Pemphigoid

Von insgesamt 7 Patienten, die an bullösem Pemphigoid erkrankt waren, und die noch keine medikamentöse Therapie erhalten hatten, wurde Blut abgenommen. Die Patienten zeigten das klinische Bild einer bullösen Dermatose und waren in der indirekten und gegebenenfalls auch in der direkten Immunfluoreszenz positiv auf bullöse Pemphigoid-Antikörper. In einigen Fällen konnte bei den Patienten ebenfalls Komplement C3 nachgewiesen werden. In der direkten Immunfluoreszenz konnten bandenförmige Ablagerungen von IgG und C3 auf Ösophagusschnitten, die mit bullösem Pemphigoid-Serum vorinkubiert waren, dargestellt werden. Das Patientenserum wurde in verschiedenen Konzentrationen (1:25, 1:50, 1:100) mit PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline) verdünnt. Sodann wurde gesunde Haut mit jeweils 50µl der verdünnten Lösungen für 30 min. bei 20°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte jeweils zweimal 5 min. in PBS-Puffer gewaschen.

Zur Qualitätssicherung hinsichtlich einer strukturellen und funktionellen in vitro-Situation, die den in vivo-Verhältnissen beim bullösen Pemphigoid entspricht, wurden von jeder Biopsie jeweils 2 Schnitte für die indirekte Immunfluoreszenz zurückgestellt. Nur Biopsate, die sich als positiv auf Immunglobulin G und C3 erwiesen, wurden samt des dazugehörigen Serums für die Adhäsionsassays verwendet.

2.3.2 Inkubation der Hautschnitte mit Serum von gesunden Probanden als Kontrollgruppe

Von 7 gesunden Probanden wurde Blut entnommen, das Serum in der oben beschriebenen Weise verdünnt und auf die Hautbiopsien gegeben. In der Immunfluoreszenz fanden sich weder Basalmembran-Antikörper, noch wurde C3 in den Seren nachgewiesen.

2.4 Adhäsionsassay

2.4.1 Aktivierung der Granulozyten und Inkubation der Hautschnitte

Das Adhäsionsassay wurde analog dem Stamper-Woodruff-Assay (Stamper and Woodruff, 1976) durchgeführt:

2.4.1.1 Aktivierung mit TNF- α

Unmittelbar vor der Überschichtung der Hautschnitte mit 40 μ l der Granulozytensuspension wurden die Granulozyten mit TNF- α (Pharma Biotechnologie, Hannover) in einer Konzentration von 10^3 IU/ml aktiviert. Die Inkubation erfolgte für 40 min. bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank.

2.4.1.2 Aktivierung mit PAF

Analog zur Aktivierung mit TNF- α wurden die Granulozyten mit PAF (Bachem, Weil am Rhein) in einer Konzentration von 10^4 IU/ml aktiviert. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 40 min. bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank.

Als Kontrollen dienten bei jedem Versuch Zellen die nicht mit TNF- α bzw. mit PAF aktiviert waren.

2.4.2. Färbung

Nach Inkubation wurden die Objektträger in RPMI-Medium gewaschen (10x), um die nicht-gebundenen Zellen zu entfernen. Die adhärennten Granulozyten wurden durch eine Toluidin-Blau-Färbung (pH 7,2) sichtbar gemacht. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (90%, 96%, 2x100%, 2xXylol) wurden die Schnitte fixiert und die überschüssige Farbe entfernt. Die Hautschnitte wurden mit einem Deckglas versehen und mit Entellan (Merck, Darmstadt) versiegelt.

2.4.3 Auszählung und Auswertung

Um die Adhärenz der Neutrophilen entlang der Basalmembran zu bewerten, wurden die Hautschnitte mittels eines Orthoplan-Mikroskops (Leica, Wetzlar) analysiert: Es wurden pro Hautschnitt (Objektiv 16×) je nach Länge des Präparates etwa 70 definierte Kästchen eines in das Okular eingelegten Rasters ausgezählt. Dies entspricht einer Fläche von ca. einem 1 mm².

2.5 Modifikation der experimentellen Bedingungen des Adhäsionsassays

2.5.1 Blockierung

Um eine reduzierte Adhäsion der Granulozyten an der Basalmembran durch eine Blockade des CD11b-Rezeptors nachzuweisen, wurden die Granulozyten mit blockierenden monoklonalen Maus-Antikörpern gegen CD11b (clone 44, überlassen von Dr. Robert F. Todd III, Ann Arbor, Michigan, USA) in einer Konzentration von 1:400 bei 4°C für 60 min. inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 10 min. bei 800×g zentrifugiert, 3x in HBSS-Lösung gewaschen, wie oben mit TNF-α aktiviert und für das Adhäsionsassay verwendet.

Als Kontrollgruppen dienten Granulozyten, die nicht mit CD11b-Antikörpern verbehandelt waren, ansonsten aber in gleicher Weise behandelt wurden.

2.5.2 Inkubation der Kryostatschnitte mit IgG-depletiertem BP-Serum

Um die pathogenetische Bedeutung des IgG beim bullösen Pemphigoid näher zu untersuchen, wurde aus dem Serum der erkrankten Patienten das IgG mittels einer Protein-A-Absorptionssäule extrahiert. Die hierfür verwendete HiTrap Protein A-Säule (Amersham Pharmacia, Freiburg) enthält in einer Matrix gebundenes rekombinantes Protein A (E.coli), welches spezifisch an die Fc-Region von IgG1, IgG2 und IgG4 bindet und etwa 25mg humanes IgG/ml aufnehmen kann.

In einem ersten Schritt wurde die Säule mittels eines Bindungspuffers auf den notwendigen pH-Wert eingestellt. Dann konnte das Serum mit einer Geschwindigkeit von 1ml/min. auf die Säule gegeben werden, um die Immunglobulin G-Fraktion zu eliminieren. Die Effizienz der Säule hinsichtlich der Eliminierung der Basalmembran-Antikörper wurde durch Testung des gereinigten Serums im

indirekten Immunfluoreszenz-Test gesichert. Nur bei einem negativen Antikörper-Befund wurde das Serum für die Inkubationsversuche verwendet. Dabei wurden die Kryostatschnitte mit 50µl des Serums für 30 min. bei 20°C in der Feuchtkammer inkubiert und anschließend 5 min. in PBS gewaschen.

Als Kontrollgruppe dienten wiederum Schnitte, die mit Serum von gesunden Probanden unter ansonsten identischen Bedingungen inkubiert worden waren.

2.5.3 Adhäsion der Granulozyten in Anwesenheit der Komplementfaktoren

C3, C4 und C5

Um den in vitro-Einfluß der Faktoren C3, C4 und C5 auf die Adhäsion der Granulozyten zu analysieren, wurden die mit BP-Seren vorinkubierten Kryostatschnitte zusätzlich mit Komplementfaktor C3 überschichtet. Komplementfaktor C3 wurde präpariert, indem 1,1 mg Komplement C3/ml aus menschlichem Serum (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) in 15 mM Natriumphosphat und 150 mM Natriumchlorid auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt wurde. Um die Anlagerung des Komplements an die bereits gebundenen Antikörper oder direkt an die Basalmembran zu propagieren, wurde C3 in einer Konzentration von 31,25mg/ml (Gammon et al. 1981) in einer 40µl-PBS-Suspension für 30 min. bei 20°C auf die Hautschnitte appliziert und anschließend die Präparate in zwei Arbeitsschritten für 5 min. mit PBS-Lösung gewaschen, um dann im Adhäsionsassay eingesetzt zu werden.

Als Kontrollgruppe dienten Hautschnitte, die mit Normal-Serum vorinkubiert wurden oder bei denen auf eine Vorinkubation verzichtet wurde.

Der Einfluß von Komplementfaktor C4 hinsichtlich des Verhaltens von Granulozyten im Adhäsionsassay wurde in weiteren Experimenten analog dem Vorgehen beim Komplementfaktor C3 durchgeführt. Dabei wurde 1mg Komplementfaktor C4 aus menschlichem Serum in 25mM Natriumphosphat und 100mM Natriumchlorid bei pH 7,2 (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) eingestellt und in einer Konzentration von 31,25 µg/ml verwendet.

In gleicher Weise wurde Komplementfaktor C5 in den Adhäsionsassays eingesetzt. Dazu wurde Komplementfaktor C5 mit 1mg Komplement aus Humanserum mit

10mM Natriumphosphat und 150mM Natriumchlorid auf einen pH von 7,2 (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) eingestellt und in einer Konzentration von 31,25µg/ml verwendet.

2.5.4 Vorbehandlung der Granulozyten mit Mycophenolat Mofetil

Mycophenolat Mofetil (10mg i.v.-Injektionspulver, Roche, Mannheim) wurde zur Herstellung einer Stammlösung in 300µl DMSO (Bachem, Weil am Rhein) und 700µl Aqua dest. gelöst und auf eine Konzentration von 10mg/ml eingestellt. Ausgehend von dieser Stammlösung wurden die Granulozyten alternativ in Mycophenolat-Konzentrationen von 1mg/ml, 100µg/ml, 10µg/ml und 1µg/ml für 15 min. bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ vorinkubiert und anschließend im Adhäsionsassay eingesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Inkubation unmittelbar nach Ansetzen der Mycophenolat-Lösung durchgeführt wurde, um der bekannten Instabilität dieser Substanz vorzubeugen.

2.5.5 Inkubation der Granulozyten mit Cyclosporin A

Cyclosporin A wurde in DMSO gelöst und in einer Konzentration von 20µg/ml verwendet. Diese Verdünnung wurde gewählt, da sie biologisch relevant ist und sich in umfangreichen Vorversuchen als effektiv erwiesen hatte (siehe Promotionsarbeit Daniel Vornhusen, Hautklinik Universität Hamburg). Die Granulozyten wurden für 10 min. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und dann in den Adhäsionsassays eingesetzt.

2.5.6 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mittels des Programms StatsXL durchgeführt. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der Student's-t-Test verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluß der BP-Seren auf die Adhäsion neutrophiler Granulozyten an der epidermalen Basalmembran

Bei diesen Versuchen wurden aus dem Blut gesunder Spender isolierte neutrophile Granulozyten auf Kryostatschnitte normaler Haut gegeben, die vorher mit dem Serum von Patienten mit bullösem Pemphigoid (BP-Serum) inkubiert wurden. Als Kontrollen dienten mit Normal-Serum inkubierte Kryostatschnitte der Haut. Alle Versuche wurden mit oder ohne TNF- α -Aktivierung der Granulozyten durchgeführt (siehe Abbildung 3.1). Analog zur Stimulation mit TNF- α wurden Granulozyten mit PAF inkubiert und die Zellen anschließend auf Kryostatschnitte gegeben. Dabei war die Stimulation der Adhäsion jedoch im Mittel um 10% niedriger als bei einer Aktivierung durch TNF- α . Dabei wurden die selben Versuchsanordnungen und -bedingungen wie bei der TNF- α -Stimulation der Granulozyten gewährt.

Insgesamt wurden 506 Kryostatschnitte der Haut ausgewertet, davon 300 Proben aus der spezifischen Versuchsreihe und 206 aus der Kontrollgruppe. Es wurden 84 Adhäsionsassays ohne Stimulation und 104 mit TNF- α -Stimulation in der Gruppe, die mit BP-Serum vorinkubiert wurde, ausgezählt. Das große Probenkollektiv war notwendig, weil zu beobachten war, sich daß in einem breiten Bereich die Adhäsion sich von der Verdünnung abhängig zeigte, mit einem Adhäsionsmaximum bei einer Verdünnung von 1:50. Die Anzahl der korrespondierenden Kontrollen betrug 62, bzw. 72 für die Versuchsreihe mit TNF- α -Stimulation.

In der Gruppe der mit BP-Serum inkubierten Kryostatschnitte der Haut lag die Anzahl der adhärenierenden Granulozyten pro mm bei einer Verdünnung von 1:50 mit einem Mittelwert von 104 Granulozyten pro mm (20,1 nach Aktivierung mit TNF- α) im Vergleich zu den anderen Verdünnungen (1:25, 1:100) am höchsten.

In der Kontrollgruppe wurden maximale Adhäsionsraten ebenfalls mit einer Konzentration von 1:50 erzielt. Hier lag der Mittelwert ohne TNF- α -Aktivierung bei 4,0, mit TNF- α -Aktivierung bei 7,9 Granulozyten pro mm. Die niedrigste Adhärenz in den Kontrollen wurde bei der Verwendung von Nährmedium (RPMI) registriert.

Für die mittlere Adhärenz ergab sich ein Wert von 1,0 ohne TNF- α -Stimulation, mit TNF- α -Aktivierung ein Wert von 2,9 Granulozyten pro qmm.

Im Vergleich der mit BP-Serum vorinkubierten Kryostatschnitte der Haut ergab in der Konzentration von 1:50 gegenüber der Kontrollgruppe (N1:50) eine signifikante Steigerung der Adhäsion um 120%. Nach TNF- α -Vorinkubation ließ sich ebenfalls eine statistisch signifikante mittlere Adhärenzsteigerung erzielen. Diese lag bei 60% (P ist <0.01).

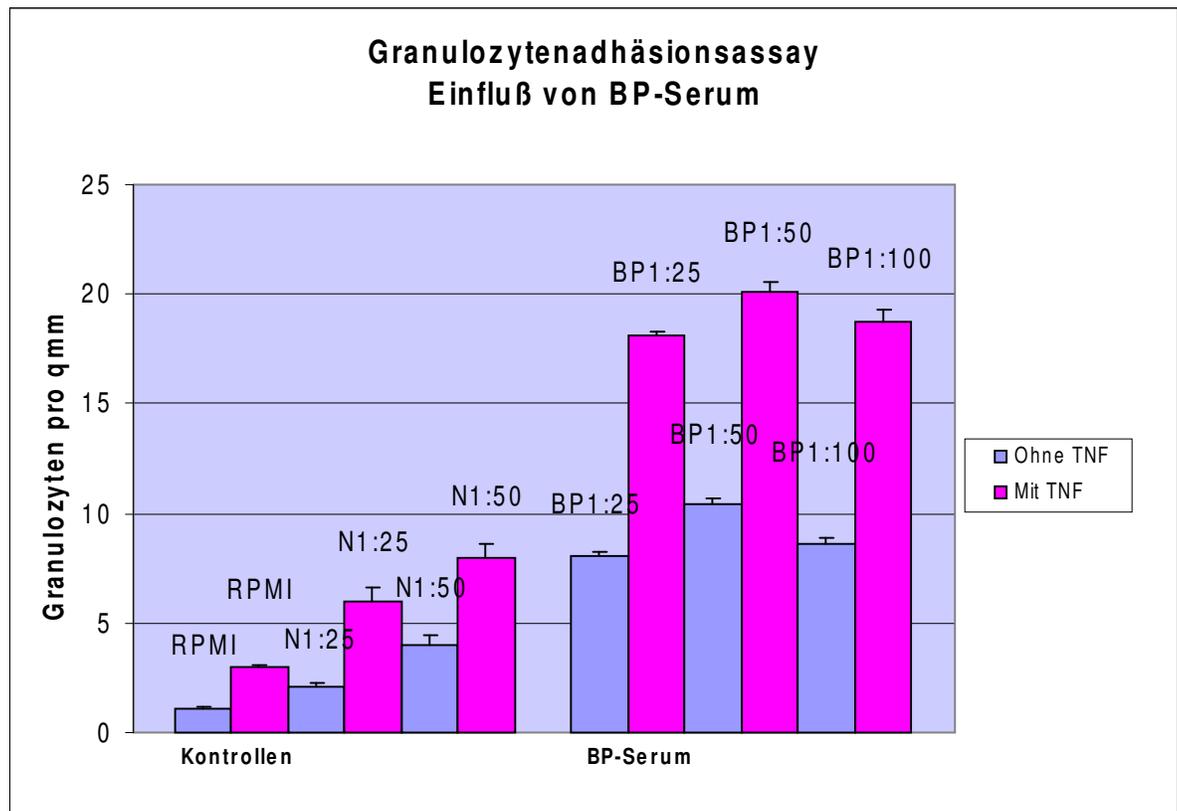


Abbildung 3.1: Adhäsionsassay unter Verwendung von Nährmedium (RPMI), Normal- und BP-Serum, jeweils mit und ohne Aktivierung der Granulozyten durch TNF.

3.2 Einfluß der Zytokinstimulation auf die Adhäsionsfähigkeit neutrophiler Granulozyten

Um herauszufinden, ob die Interaktion von Granulozyten mit epidermalem Gewebe von der Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen abhängig ist, wurden Granulozyten vor dem Einsatz im Adhäsionsassay alternativ mit TNF- α oder PAF

inkubiert. Dabei wurde von der Überlegung ausgegangen, daß Zytokine zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche von Neutrophilen führen könnte. Tatsächlich zeigte sich, daß eine deutliche Steigerung der Akkumulation von Granulozyten durch die Vorinkubation mit TNF- α induziert werden kann. Bei der Verwendung von PAF ist ebenfalls eine Stimulation der Adhäsion zu beobachten. Allerdings liegt diese im Mittel 20% unter der TNF- α -vermittelten Granulozytenstimulation. Durch die Aktivierung von Granulozyten durch Zytokine im Adhäsionsassay wird allerdings kein höherer Signifikanzstandard erreicht im Vergleich zu den Ergebnissen ohne Zytokinstimulation (Abb. 2). Die Anzahl der ausgewerteten Kryostatschnitte beträgt 24 pro Versuchsgruppe.

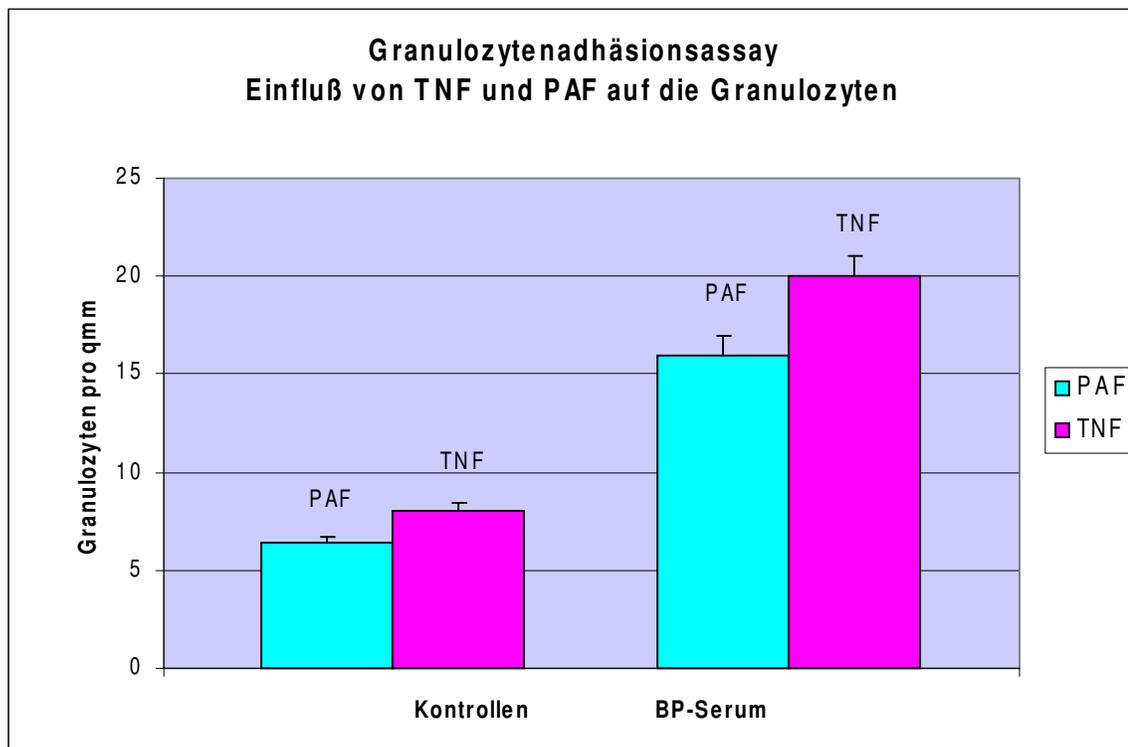


Abbildung 3.2: Adhäsionsassay unter Verwendung von TNF- α und PAF

3.3 Einfluß von CD11b auf das Bindungsverhalten der Granulozyten im Adhäsionsassay

In diesen Versuchen wurden Granulozyten vor der Verwendung im Adhäsionsassay mit monoklonalen CD11b-Antikörpern vorinkubiert. Wiederum wurde BP-Serum, bzw. als Kontrolle Normal-Serum, zur Vorinkubation der dermalen Kryostatschnitte verwendet. Um die regulativen Effekte des Entzündungsmediators TNF- α zu

untersuchen, wurde die Granulozyte einer Versuchsreihe mit TNF- α stimuliert, die Granulozyten der anderen Versuchsserie wurden ohne Aktivierung verwendet (siehe Abbildung 3.2).

368 Kryostatschnitte der Haut wurden insgesamt in diesem Versuch ausgewertet. Die Experimente mit BP-Serum wurden in 214 Assays durchgeführt, bzw. in 154 Kontrollassays unter Verwendung von Normal-Serum.

Sowohl die mit BP-Serum, als auch die mit Normal-Serum inkubierten Kryostatschnitte der Haut wiesen eine Hemmung der Granulozytenadhärenz nach Zugabe von CD11b-Antikörpern auf. Die größte Inhibition (38%) zeigten die Versuchsserien mit nicht-aktivierten Granulozyten und BP-Serum. Die Hemmwirkung von CD11b lag beim korrespondierenden Versuch unter Verwendung von aktivierten Granulozyten bei 18,5%. Die Auswertung der Kontrollen lag in einem mittleren Hemmbereich der Adhärenz von 13,5%. Die Ergebnisse erreichen eine Signifikanz von $p < 0,01$ in allen Versuchsgruppen.

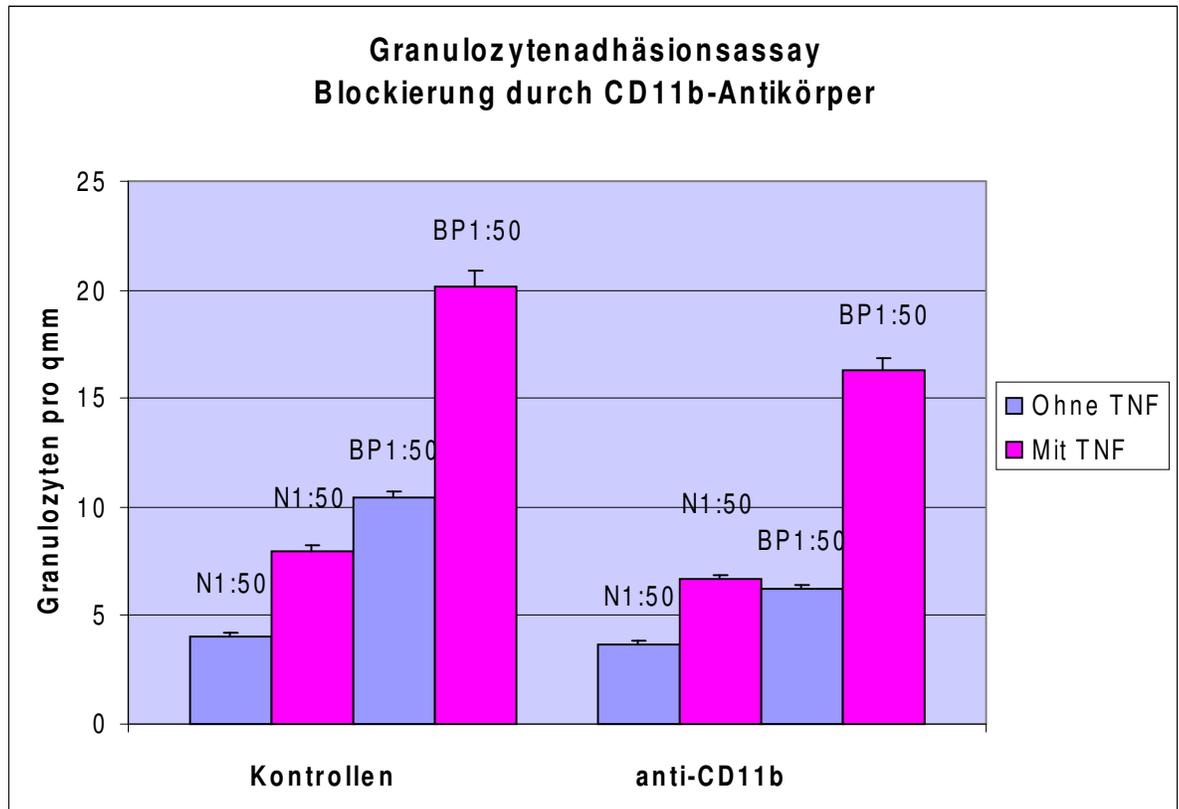


Abbildung 3.3: Einfluß von CD11b auf das Bindungsverhalten der Granulozyten im Adhäsionsassay

3.4 Der Einfluß von IgG im Granulozytenadhäsionsassay

Das Granulozytenadhäsionsassay wurde durch die Verwendung IgG-depletierter Normal-Seren und IgG-depletierter Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid variiert (siehe Abbildung 3.3). Die aufgereinigten Seren wurden in der oben beschriebenen Weise im Adhäsionsassay benutzt. Als Kontrolle diente eine Versuchsgruppe mit nicht-vorbehandelten Seren. Wiederum wurden sowohl TNF- α -aktivierte, als auch nicht-aktivierte Granulozyten verwendet.

Die Gesamtzahl der Proben beläuft sich auf 390 Analysen. Die Anzahl der aufgereinigten Normal-Seren beträgt 8 Analysen; die der bullösen Pemphigoid-Seren 60 Analysen. Bei den Kontrolluntersuchungen wurden 322 Proben analysiert.

Sowohl bei Verwendung von Normal- als auch bei Patienten-Serum wird eine statistisch signifikante Reduktion der Granulozytenadhäsion im Vergleich zur

Kontrollgruppe erreicht. In der Gruppe der BP-Seren ist die Adhärenz signifikant höher: Hier liegt die mittlere Reduktion der Adhärenz bei 24,5%, während bei den Normal-Seren die mittlere Reduktion der Adhärenz 22,5% beträgt. Im Gruppenvergleich zu den Normal-Kontrollen wird mit einem $p < 0,01$ Signifikanz erreicht.

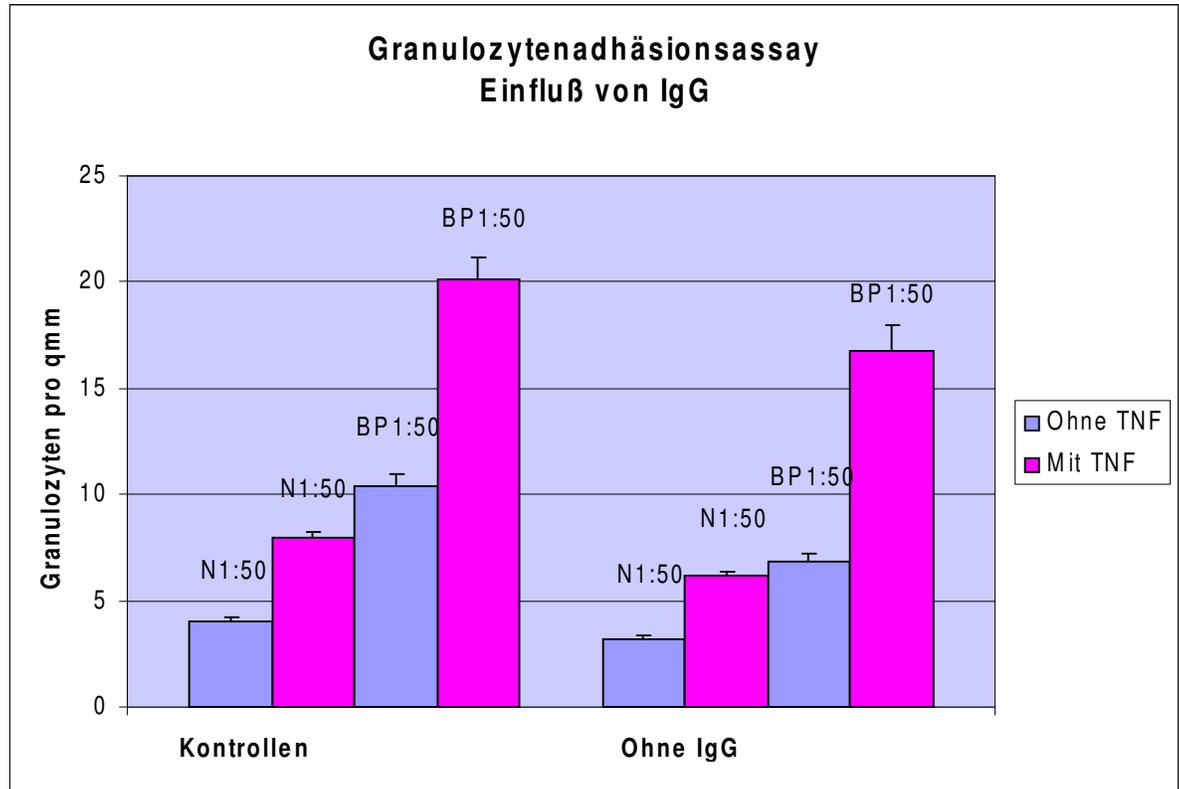


Abbildung 3.4: Der Einfluß von IgG im Granulozytenadhäsionsassay

3.5 Effekte von Komplementfaktor C3 im Adhäsionsassay

Eine weitere experimentelle Variante des Adhäsionsassays wurde durch Zugabe des Komplementfaktors C3 zur Inkubationslösung der Haut-Kryostatschnitte realisiert. Anschließend wurde das Assay in der bereits beschriebenen Weise durchgeführt.

Zur Analyse des Faktors C3 erfolgten insgesamt 32 Assays unter verschiedenen experimentellen Bedingungen und korrespondierenden Kontrollen.

Alle Probestruppen wiesen eine statistisch signifikante Steigerung der Adhäsion unter dem Einfluß von Komplementfaktor 3 im Vergleich zu ihren Kontrollen ($p < 0,01$)

auf. Die Gruppe der bullöses Pemphigoid-Seren ohne TNF- α -Aktivierung zeigt die maximale Adhäsionssteigerung (47%). Die mittlere Adhäsionssteigerung liegt über allen Gruppen bei 28%.

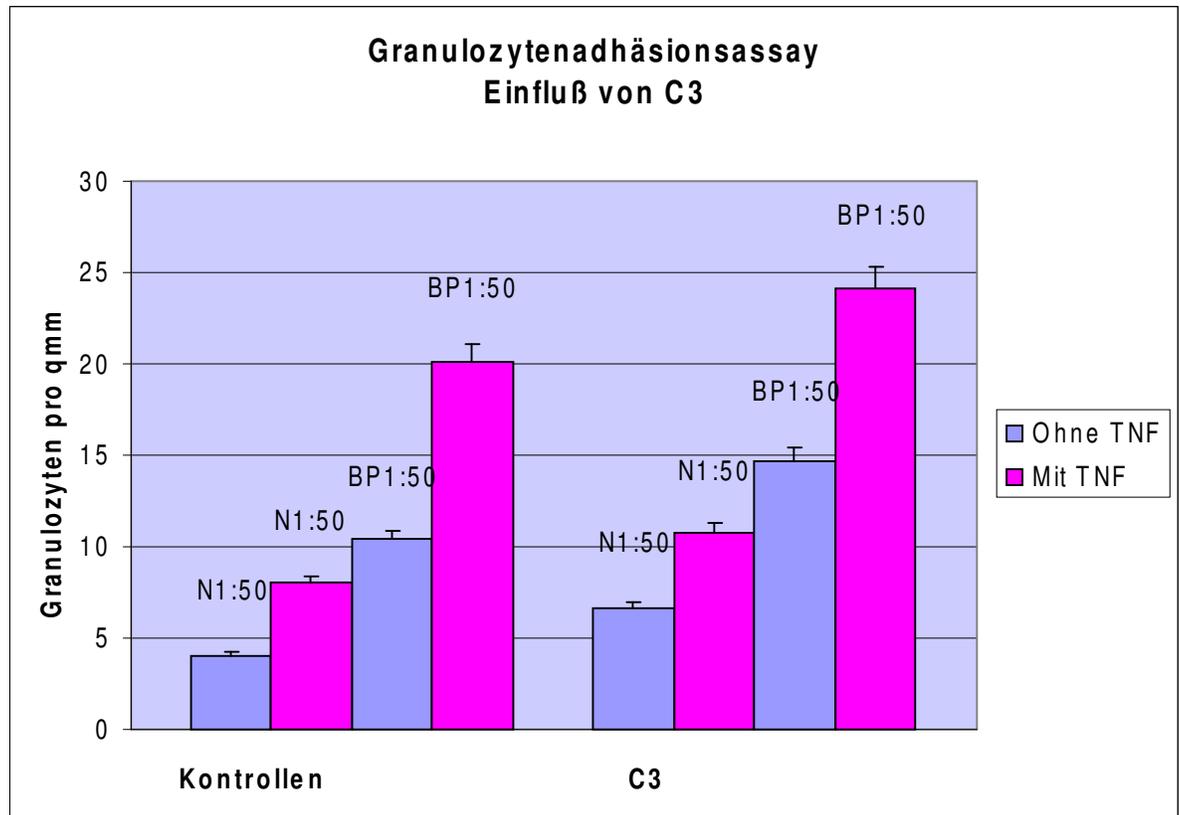


Abbildung 3.5: Granulozytenadhäsionsassay modifiziert durch die Zugabe von Komplementfaktor C3

3.6 Effekte von Komplementfaktor C4 im Granulozytenadhäsionsassay

Das Adhäsionsassay wurde durch Zugabe des Komplementfaktors C4 zu den Haut-Kryostatschnitten modifiziert. Danach wurde das Adhäsionsassay in der oben beschriebenen Weise durchgeführt (siehe Abbildung 3.5).

Es wurden jeweils 48 Versuche und korrespondierende Kontrollen unter der Verwendung von C4 durchgeführt.

Alle Assays mit Komplementfaktor C4 wiesen eine statistisch signifikante Steigerung der Adhäsion auf ($p < 0,01$). Die Gruppe der Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid ohne TNF- α -Aktivierung der Granulozyten zeigte eine

maximal zu erzielende Adhäsionssteigerung (43%). Die mediale Adhäsionssteigerung lag in den anderen Gruppen im Mittel bei 23%.

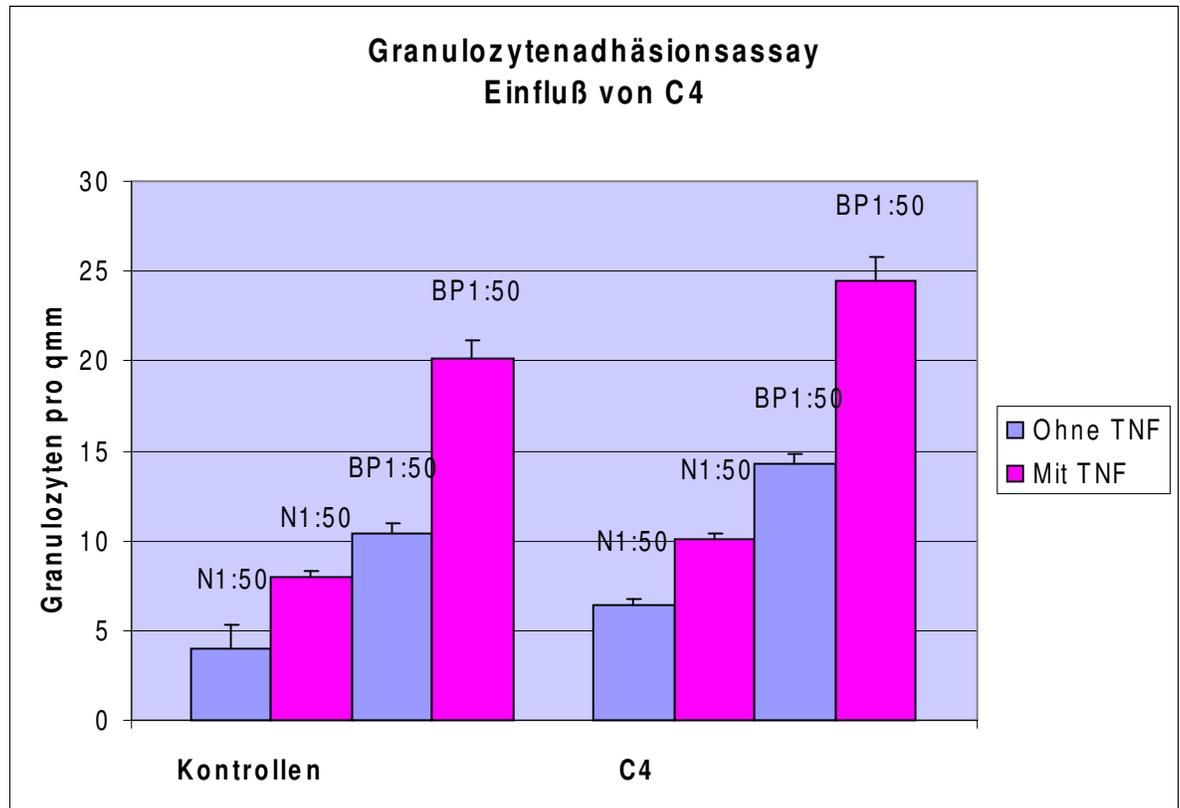


Abbildung 3.6: Der Einfluß von Komplementfaktor C4 im Granulozytenadhäsionsassay

3.7 Effekte von Komplementfaktor C5 im Adhäsionsassay

Das Adhäsionsassay wurde durch Zugabe des Komplementfaktors C5 modifiziert. Danach wurde der Versuch in der oben beschriebenen Weise durchgeführt (siehe Abbildung 3.6).

Die biologischen Einflüsse von C5 wurden in jeweils 48 Versuchen sowie den korrespondierenden Kontrollen analysiert.

In allen experimentellen Versuchen zeigte sich eine statistisch signifikante Steigerung ($p < 0,01$) der Adhäsion durch C5. In der Gruppe der Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid ohne TNF- α -Aktivierung der Granulozyten wurden die

höchste Adhäsionssteigerung gemessen (40%). Der mittlere Wert in den anderen Gruppen lag bei 23%.

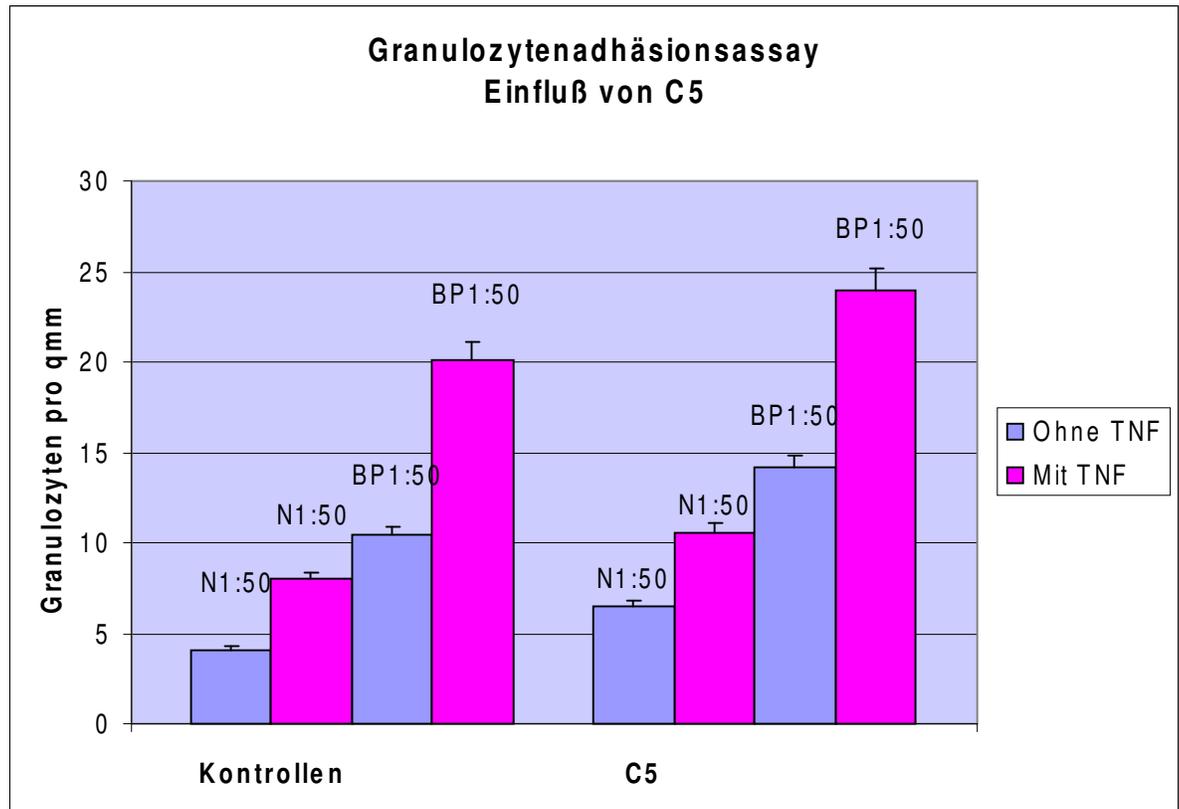


Abbildung 3.7: Der Einfluß von Komplementfaktor C5 auf das Bindungsverhalten der Granulozyten im Adhäsionsassay

3.8 Einfluß des Medikaments Mycophenolat Mofetil im Granulozytenadhäsionsassay

Eine weitere Modifikation des Adhäsionsassays wurde durch die Vorinkubation der Granulozyten mit Mycophenolat Mofetil verwirklicht. Vor der Inkubation der Granulozyten in unterschiedlichen Konzentrationen des Medikaments wurden die Zellen mit TNF- α stimuliert (siehe Abbildung 3.7). Zur Durchführung des Adhäsionsassays wurden die experimentellen Bedingungen in der oben beschriebenen Weise berücksichtigt.

Es wurden 41 Versuche unter Verwendung verschiedener Verdünnungen des Medikaments durchgeführt (1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml und 1 mg/ml). Als Kontrolle diente der jeweilige Versuchsaufbau ohne das MMF.

Die Analyse der Ergebnisse aller Versuchsanordnungen ergibt eine statistisch signifikante Reduktion der Adhäsion. Verschiedene Konzentrationen des Medikaments führten zu einem differenten Bindungsverhalten. Die Unterschiede in den Verdünnungsgruppen waren statistisch nicht signifikant. Es war keine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung erkennbar.

Im Mittel liegt die Hemmung der Granulozytenadhäsion pro mm bei 21%. Der Unterschied zwischen allen Medikamentenverdünnungen und den Kontrollen (ohne Medikamente) zeigte Signifikanz ($p < 0,01$).

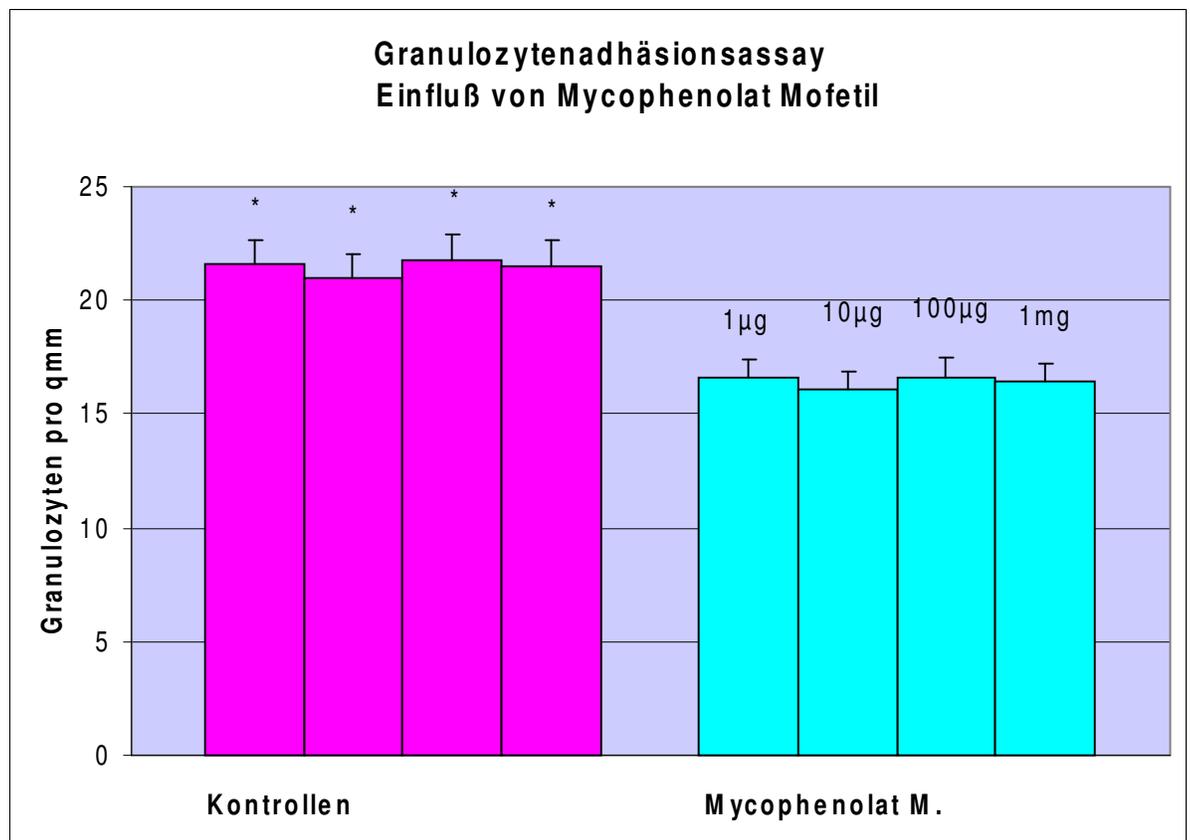


Abbildung 3.8: Auswirkungen des Medikaments Mycophenolat Mofetil auf das Bindungsverhalten der Granulozyten im Adhäsionsassay. * Substitution mit 10 µl DMSO pro ml Granulozytensuspension ohne MMF.

3.9 Anwendung des Medikaments Cyclosporin A im Granulozytenadhäsionsassay

Um den Einfluß von Cyclosporin A im Adhäsionsassay zu bestimmen, wurden Granulozyten mit dem Medikament vorinkubiert und dann im Adhäsionsassay eingesetzt (siehe Abbildung 3.8). In einer zweiten Versuchsreihe wurden diese mit TNF- α vorstimuliert. Insgesamt wurden 4 Adhäsionsassays durchgeführt. Cyclosporin A kam in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ zum Einsatz. Als Kontrolle diente die korrespondierende Versuchsanordnung ohne Cyclosporin A.

Die Analyse der Ergebnisse aller Assays ergab eine statistisch signifikante Reduktion der Adhäsion im Vergleich zu den Kontrollen ($p < 0,01$). Diese betrug bei TNF- α -stimulierten Granulozyten 24%, während bei den Versuchen mit unstimulierten Granulozyten die Verminderung der Bindung sehr viel ausgeprägter war und im Mittel 44% betrug.

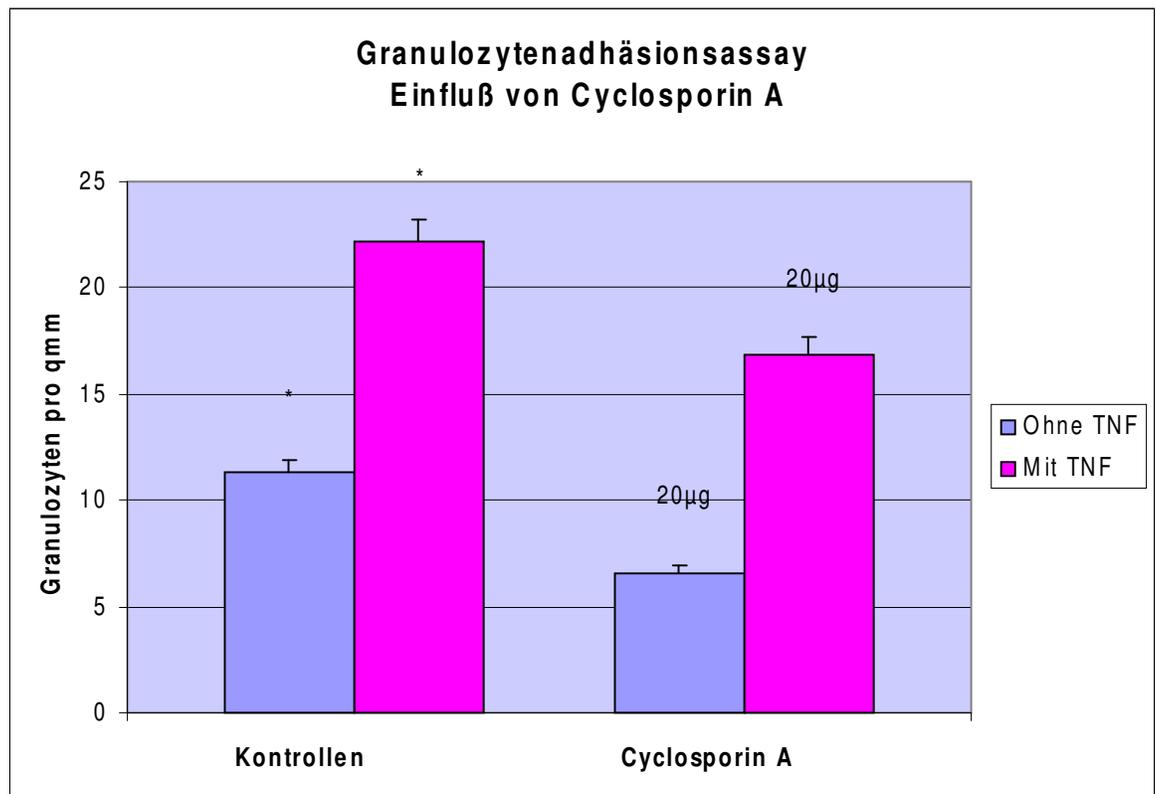


Abbildung 3.9: Effekte des Medikaments Cyclosporin A im Adhäsionsassay.

*Zugabe von 10 µl DMSO ohne Cyclosporin A.

3.10 Blasenbildung an den Hautschnitten

Um die Auswirkungen neutrophiler Granulozyten an der Basalmembran zu bestimmen, wurden die Kryostatschnitte der Haut lichtmikroskopisch auf lytische Bezirke untersucht. Bei einer semiquantitativen lichtmikroskopischen Analyse zeigte sich, daß das Ausmaß der Desintegration an der epidermalen Grenzschicht zur Menge der akkumulierten Granulozyten korrelierte, also besonders bei den Assays zu beobachten war, die mit den Komplementfaktoren C3, C4 und C5 vorinkubiert waren (siehe Abb. 3.9 und 3.10).

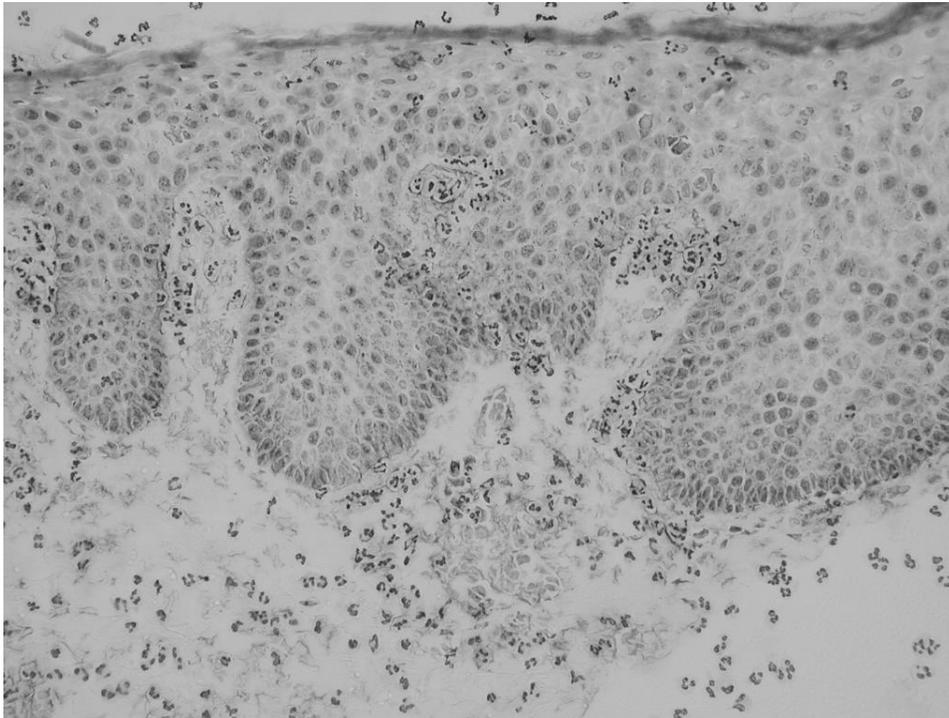


Abbildung 3.10: Granulozytenanlagerungen bevorzugt im Bereich der Basalmembranzzone

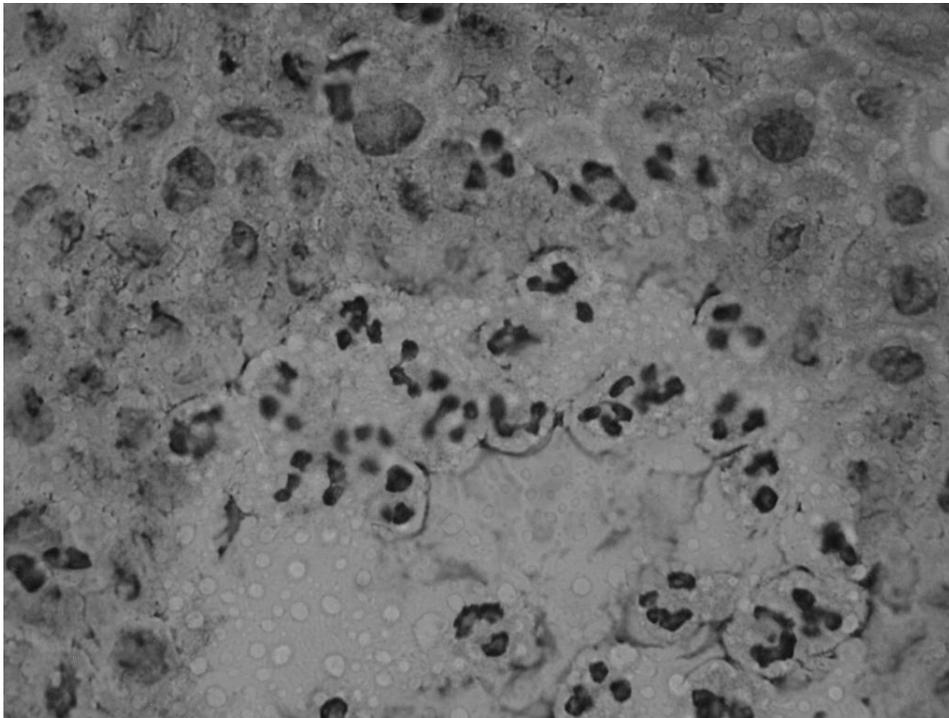


Abbildung 3.11: Lytische Bereiche im Bereich der Basalmembran bei Granulozytencluster

4. Diskussion

4.1 Methoden

4.1.1 Adhäsionsassay

Bei den Experimenten wurde ein Granulozytenadhäsionsassay verwendet, das von Stamper und Woodruff 1972 in Form eines ‘Frozen Section Assays‘ zuerst entwickelt wurde und in der Folge als probate Technik für Zell-Gewebs-Interaktionen in der Folge etabliert werden konnte (Stamper u. Woodruff 1976).

Dieser Ansatz wurde einige Jahre später auch benutzt, um die Interaktionen zwischen T-Zellen und Keratinozyten zu untersuchen (Nickoloff u. Griffiths 1989). In weiteren Untersuchungen wurde diese Technik verwendet, um die Adhäsion von T-Lymphozyten und Neutrophilen an der Epidermis von Psoriasis-Patienten zu untersuchen (Barker et al. 1992).

Analog zu diesen Fragestellungen wurden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines ‘Frozen Section Assays‘ die Interaktionen zwischen Granulozyten, epidermalen Strukturen und Entzündungsmediatoren als Rekonstrukt der Pathogenese des bullösen Pemphigoids analysiert.

4.1.2 Granulozytenisolierung

Die Funktion der neutrophilen Granulozyten kann durch Modulation der Expression von Adhäsionsmolekülen auf ihrer Zelloberfläche beeinflusst werden. Dies gilt auch für das Bindungsverhalten dieser Zellen an Gewebsdeterminanten in vivo und in vitro. Reguliert wird die Expression der Oberflächenmoleküle sowohl durch die Art, als auch die Bedingungen der Zellisolierung, wie zum Beispiel der Temperatur, des pH-Werts und der Osmolarität der Separationsmedien (Forsyth u. Levinsky 1990; Kuijpers et al. 1991). Viele Oberflächenmoleküle, unter anderem auch die β 2-Integrine, sind in der Zirkulation in vivo nur in geringem Maße auf der äußeren Zellmembran exprimiert. Die CD11b-Expression reflektiert nicht nur die adhäsive Funktion der Granulozyten, sondern zugleich ihren Aktivitätszustand (Rebuck u. Finn 1994).

Um die Granulozyten möglichst schonend von Erythrozyten und anderen Leukozyten zu trennen, wird die Dextran-Sedimentation zur Zellisolierung empfohlen. Damit ist eine zu vernachlässigende Veränderung bezüglich der Adhäsionsmoleküle, speziell des CD11b, im Vergleich zu konkurrierenden Isolationsmethoden gewährleistet (Macey et al. 1995). Die Lyse der bei den Granulozyten verbleibenden Erythrozyten birgt ein weiteres Risiko zur Hochregulation von β -2-Integrinen und damit zur Verfälschung der experimentellen Ergebnisse (Haslett et al. 1985). Ein weiterer Vorteil der Zellseparation mit Dextran besteht in einer geringeren CD18-Expression bei nicht-aktivierten Granulozyten im Vergleich zur Erythrozyten-Lyse-Methode (Bloemen et al. 1996). Dadurch lässt sich ein besseres Ansprechen der Zellen auf Zytokine wie PAF oder TNF- α gewährleisten. Auf die Lyse der verbliebenen Erythrozyten wird deshalb nach Möglichkeit verzichtet. Grundlegende methodische Experimente haben ergeben, dass die Granulozyten bei der Verwendung von Vollblut in ihrer Funktion am wenigsten beeinflusst werden (McCarthy u. Macey 1993; Rebuck u. Finn 1994). Dieser Vorteil wird durch die adversen Effekte einer großen Erythrozytenmenge jedoch egalisiert.

Die Zellisolierung sowie alle weiteren Schritte des Adhäsionsassays wurden bei Raumtemperatur bzw. 37°C (Inkubationsvorgänge) durchgeführt, da die Adhäsion von Granulozyten an die Epidermis oder an das Endothel einen energieabhängigen Prozeß darstellt, der auf die normale metabolische Arbeitstemperatur des Organismus angewiesen ist und deshalb bei niedrigeren Temperaturen deutlich geringer ausfällt (Bloemen et al. 1996; Kishimoto et al. 1989). Experimentelle Anordnungen, die eine Arbeitstemperatur von 4°C verwenden, sind deshalb kritisch zu betrachten. Vermieden werden sollte auch ein Abkühlen auf 4°C und anschließendes Wiedererwärmen der Neutrophilen auf 37°C. Hierdurch wird die Expression von Leukozytenintegrinen supprimiert und die experimentelle Aussage verfälscht (Forsyth u. Levinsky 1990; Sengelov et al. 1993).

4.1.3 Aktivierung der Granulozyten durch Zytokine

Es konnte gezeigt werden, daß die Adhärenz durch die Aktivierung von Granulozyten stimuliert werden kann. Vermutlich läuft dieser Prozeß über die vermehrte Expression von Oberflächenrezeptoren, insbesondere

Adhäsionsmolekülen, ab. Auch in den hier vorgestellten Experimenten zeigte sich eine Steigerung der Akkumulation granulozytärer Zellen an der Basalmembran bzw. dermo-epidermalen Junktionszone und im Bereich der Bullae. Im Mittel war die Steigerung der Adhäsion über alle Untersuchungsgruppen für TNF- α umca. 20% höher als bei Verwendung von PAF. Es konnte aber nicht bewiesen werden, daß durch die verschiedene Zytokinstimulation die Diskriminierung zwischen den Einflussfaktoren und ihren Kontrollgruppen statistisch aussagekräftiger wurde.

4.1.4 Die in vitro-Blasenbildung analog zum bullösen Pemphigoid

Beim bullösen Pemphigoid ist neben dem klinischen Bild und dem histologischen Befund der Nachweis der Autoantikörper von entscheidender diagnostischer Bedeutung. Erstmals wiesen Jordan et al. 1967 in der Haut und im Serum von BP-Patienten diese spezifischen Autoantikörper nach (Jordan et al. 1967). In periläsionaler Haut finden sich in über 90% lineare Ablagerungen von IgG an der dermo-epidermalen Junktionszone (Kippes et al. 1999; Korman 1998). Als sensitivstes Substrat für die indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von BP-Autoantikörpern hat sich humane Haut erwiesen, bei der artifiziell Spalträume mit Hilfe einer einmolaren Natriumchloridlösung erzeugt wurden. Man geht davon aus, dass durch diese Technik charakteristische Epitope freigelegt werden, die eine Bindung der BP-Autoantikörper ermöglichen. Die Bindungsstellen für die Autoantikörper finden sich im epidermalen Stratum, seltener auch kombiniert an der epidermalen oder dermalen Seite des künstlichen Spalts (Kelly u. Wojnarowska 1988). Als Zielantigen wurde mittels Immunpräzipitation und Westernblot ein 230kDa schweres Protein identifiziert, das sich als Bestandteil der hemidesmosomalen Plaques erwies (Stanley et al. 1981). Ein weiteres Autoantigen ist das BP180, ein transmembranöses Glykoprotein, welches ebenfalls mit hemidesmosomalen Plaques assoziiert ist. Mit dem zentralen Anteil überspannt das Protein die Lamina lucida und reicht mit dem C-Terminus in die Lamina densa (Herako et al. 1998; Masunaga et al. 1997). Die NC16A-Domäne, die sich extrazellulär unmittelbar an die Zytoplasmamembran anschließt, stellt einen immundominanten Abschnitt von BP180 dar. BP-Seren reagieren lediglich mit den N-terminalen 45 Aminosäuren dieser Domäne (Zillikens et al. 1997).

Es wird angenommen, daß die Bindung der Autoantikörper an die Pemphigoid-Epitope über eine Freisetzung von Sekretionsprodukten von Entzündungszellen (neutrophilen- und eosinophilen Granulozyten), mit oder ohne gleichzeitige Aktivierung von Komplementfaktoren, zu einer Störung der Kontinuität zwischen Epidermis und Dermis und damit zur Bildung subepidermaler Blasen führt (Imber et al. 1987, Sitaru C et al. 2002). Die Bindung der Antikörper alleine ist nicht in der Lage, eine Blasenbildung zu induzieren (im Gegensatz zum Pemphigus).

In den vorliegenden Experimenten kann gezeigt werden, dass eine Inkubation in BP-Seren, das heißt offenbar eine Bindung von Pemphigoid-spezifischen Autoantikörpern, eine gesteigerte Adhäsion der Granulozyten an die Basalmembran dermalen Strukturen induziert. Das Adhäsionsverhalten der Granulozyten erwies sich als abhängig vom Grad der Aktivierung und konnte durch die Stimulation mit TNF- α und in geringerem Maße auch durch die Stimulation mit PAF signifikant gesteigert werden. Interessanterweise ließen sich Reaktionen auf die Bindung der Granulozyten im Gewebe demonstrieren, indem im Bereich adhärerender Zellen Vakuolen in Basalmembran-nahen Arealen nachweisbar waren. Die eindruckvollsten Veränderungen fanden sich bei einer Verdünnung von 1:50, während sowohl niedrigere Konzentrationen (1:100), also auch höhere Konzentrationen (1:25) der BP-Seren sich als weniger effektiv erwiesen. Diese Beobachtung ist vor dem Hintergrund beachtenswert, daß es in vivo keine Korrelation zwischen der dermalen Symptomatik und dem Antikörpertiter zu geben scheint (Liu u. Diaz 2001). Möglicherweise sind inhibierende Komplexbildungen und/oder Aggregation der Autoantikörper für die geringere Effektivität der höheren Konzentration verantwortlich.

Die Analogie zwischen der hier verwendeten Versuchsanordnung und der Pathogenese des bullösen Pemphigoids wird durch die Beobachtung unterstrichen, daß die Lokalisation der vermutlich in vivo verantwortlichen Antigene der dermo-epidermalen Junktionszone exakt dem Bereich entspricht, in dem die Granulozyten im 'Frozen Section Assay' bevorzugt adhäreren.

Erste Hinweise auf eine pathogenetische Rolle der Neutrophilen am bullösen Pemphigoid wurden durch die Analyse von Blaseninhalt erhalten, da neutrophile und

eosinophile Granulozyten das Blasenfluid dominieren. Außerdem zeigten sich im histologischen Bild Granulozytenablagerungen entlang der Basalmembranzone und im Blasenlumen (Beutner et al. 1968). Um nachzuweisen, dass die Granulozyten für die Blasenbildung verantwortlich sind, wurden verschiedene Experimente unternommen. Gammon et al. (1980) versuchten mit einem in vitro-Adhäsionsassay (Leucocyte Attachment Method) analog der hier verwendeten Technik, eine vermehrte Leukozytenadhäsion an der dermo-epidermalen Junctionszone an BP-Serum-inkubierter Haut nachzuweisen (Gammon et al. 1980). Ein Nachteil dieses experimentellen Vorgehens ist die Verwendung unseparierter Leukozytenpopulationen. Tatsächlich wurde eine vermehrte granulozytäre Adhäsion beobachtet, wenn die Zellen mit BP-Serum vorinkubiert waren, während durch eine Inkubation in Pufferlösung keine signifikante Adhäsion nachweisbar war. Die Autoren stellten die These auf, daß eine Immunadhärenz, das heißt eine Andockung der Zellen durch gebundenes IgG, nicht der alleinige Pathomechanismus des bullösen Pemphigoids ist und andere Einflüsse, wie zum Beispiel Komplement eine Rolle spielen könnten. Diese These wurde in einer anderen Studie allerdings nicht unterstützt, da diese Autoren zeigen konnten, daß sich Zellen mit IgG-Rezeptoren auch in Abwesenheit von Komplementfaktoren an IgG-überzogene Oberflächen (inklusive Haut) anheften (Messner u. Jelinek 1970).

Untersuchungen mit aufgereinigten Granulozytenpopulationen wurden mit der ‘Modified Leucocyte Attachment Method‘ etabliert. Hierbei wurde die Wanderung der Granulozyten über die Hautschnitte mit einem Phasenkontrastmikroskop betrachtet (Gammon et al. 1981). In diesen Experimenten wurde wiederum gesunde Haut verwendet, die vorher mit BP-Serum inkubiert wurde. Um Migration und Adhäsion der Granulozyten zu analysieren wurde die Methode nach McCutcheon verwendet, bei der zeitabhängig die Distanz jeder Zelle von der Basalmembran durch die von der Zelle zurückgelegte Strecke geteilt wird: Es demonstriert sich eine signifikante Migration der Zellen in Richtung der Basalmembran. Es konnte ferner gezeigt werden, daß die Granulozyten während des Migrationsprozesses Pseudopodien ausbilden. Chemotaxis und Adhäsion waren offenbar von der Anwesenheit aktivierten Komplements abhängig, da nur die in Normal-Seren vorinkubierten Granulozyten eine gesteigerte Adhärenz erkennen ließen. Daraus

schlossen die Autoren, daß Komplementfaktoren eine wichtige Rolle in der Pathogenese des bullösen Pemphigoids spielen. Im Gegensatz zu den hier vorgestellten Experimenten fand allerdings keine Stimulation der Zellen mit TNF- α oder anderen Zytokinen statt. Auch eine Vakuolenbildung im Gewebe wurde bei diesen Versuchen nicht beobachtet.

Das erste erfolgreiche tierexperimentelle Modell zum bullösen Pemphigoid wurde von Liu et al (1993) entwickelt (Liu et al. 1993). Die Autoren konnten erstmals die Pathogenität der BP-Autoantikörper nachweisen, indem sie gegen BP180 gerichtete polyklonale Kaninchenantikörper in Mäuse injizierten. Die Versuchstiere entwickelten subepidermale Blasen, die denen des bullösen Pemphigoids beim Menschen ähnelten. Der Versuch, tierexperimentell eine Blasenbildung durch Antikörperinjektion zu provozieren, war offenbar daran gescheitert, daß sich die BP180-Epitope der verschiedenen Spezies unterscheiden. Liu und Mitarbeitern gelang jedoch die Generation von Maus-spezifischen Antikörpern, die in der Lage waren, Blasenbildung zwischen Epidermis und Dermis zu provozieren. Die histologische Analyse der Haut ließ eine subepidermale Blasenprogression mit Akkumulation von Neutrophilen im Blasenlumen und der angrenzenden Dermis erkennen.

Um eine Kausalität zwischen der Neutrophilenansammlung und der Blasenbildung nachzuweisen, injizierte Liu die BP180-Antikörper einer Mauslinie, die das Enzym Gelatinase B nicht exprimieren können (Liu et al. 1998). Gelatinase B wird von Neutrophilen, Makrophagen, Osteoklasten und Trophoblastenzellen exprimiert. Dieses Enzym greift mehrere extrazelluläre Proteine wie Aggrekan, Typ IV Kollagen und Elastin, aber auch funktionelle Proteine wie α -1-Proteinease-Inhibitor an (Hibbs et al. 1985; Liu et al. 1998; Senior et al. 1991). Die Gelatinase-defiziente Mauslinie entwickelte im Vergleich zur Kontrollgruppe keine subepidermalen Blasen. Diese Beobachtungen deuten auf eine pathogenetische Bedeutung der neutrophilen Granulozyten, bzw. ihrer Granula-ständigen Gelatinase hin. Analog zu diesen Experimenten wurde versucht, ein bullöses Pemphigoid bei Elastase-defizienten Mäusen zu provozieren (Liu et al. 2000). Diese Versuchsanordnung wurde gewählt, da Elastase, ebenfalls Bestandteil der Neutrophilen-Granula, verantwortlich für die Digestion der Proteine der Extrazellulärmatrix ist (Senior u. Campbell 1983; Weiss

1989). Es zeigte sich in diesen Experimenten, daß das bullöse Pemphigoid bei Mäusen wiederum nicht induzierbar ist, offenbar weil zu einer Blasenbildung der vollständige enzymatische Apparat der Neutrophilen vorhanden sein muß.

Diese tierexperimentellen Ergebnisse stehen im Einklang mit den hier vorliegenden Experimenten, die nahelegen, daß eine Blasenbildung die Präsenz sowohl von Antikörpern als auch die Adhäsion von Neutrophilen an die epidermalen Strukturen voraussetzt. Darüber hinaus konnten Hinweise dafür gefunden werden, daß die Adhärenz der Neutrophilen durch Entzündungsmediatoren wie TNF- α und PAF modifiziert werden kann.

Dies wiederum entspricht dem Funktionsprofil granulozytärer Zellen in vivo. Die Induktion gesteigerter Adhäsion von Granulozyten an der Basalmembran der Epidermis in der 'Frozen Section Technik' ist bereits von anderen Arbeitsgruppen etabliert worden (Gammon et al. 1990). Die Qualität dieser Methode konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Die Gründe für das Auftreten des bullösen Pemphigoids bei vorwiegend älteren Menschen werden seit langem kontrovers diskutiert. Einer überzeugenden Hypothese zur Folge könnten die Gründe hierfür sowohl in der höheren Inzidenz von Autoantikörpern bei älteren Menschen, als auch in der Exponierung von Autoantigenen in der extrazellulären Matrix durch alterskorreliert degenerative Prozesse liegen. So könnte es im höheren Lebensalter bei Patienten mit bullösem Pemphigoid zu einer Freilegung der BP-Antigene, etwa durch Lockerung der epidermodermalen Verankerung kommen. Durch die Freilegung der Antigene würde eine Bindung der Autoantikörper an die epidermale Basalmembran möglich.

4.1.5 Blockierung des Adhäsionsprozesses durch CD11b-Antikörper

Das zelluläre Adhäsionsmolekül CD11b/CD18 gehört zur Gruppe der β 2-Integrine und spielt eine wichtige Rolle beim Austritt der Neutrophilen aus den Blutgefäßen in entzündlich veränderte Areale. Darüber hinaus ist CD11b/CD18 mitverantwortlich für die Interaktion von Immunzellen untereinander und für die Adhäsion an Fibroblasten, Keratinozyten und die extrazelluläre Matrix (Zhou et al. 1994). Im Falle der Keratinozyten ist der korrespondierende Bindungspartner die dritte N-

terminale Domäne von ICAM-1. Weitere Liganden sind Fibrinogen, der Gerinnungsfaktor X, Elastase und die Komplementkomponente C3bi.

In der vorliegenden Studie wird gezeigt, daß die hemmende Wirkung von CD11b-Antikörpern bei Verwendung TNF- α -aktivierter Granulozyten und bullösem Pemphigoid-Serum bei weitem am ausgeprägtesten ist. Die Hemmung war bei Verwendung nicht-aktivierter Granulozyten oder Antikörper-freier Normal-Seren signifikant geringer. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß der CD11b/CD18-Rezeptor der Granulozyten eine pathogenetisch wichtige Rolle bei der Entstehung des bullösen Pemphigoids spielt.

Über das Expressionsprofil von CD11b/CD18 in der Haut unter pathologischen Bedingungen ist wenig bekannt. Eine Studie bei kutan-vaskulären Reaktionen zeigte eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Infiltration durch Neutrophile bzw. Monozyten und der Anzahl der CD11b-positiven Granulozyten beim Sweet-Syndrom. Hierbei konnte in sequentiellen Hautschnitten gezeigt werden, daß die epidermotropen Granulozyten CD11b/CD18 in höherem Maße als CD11a/CD18 oder CD11c/CD18 exprimieren. Daraus konnte geschlossen werden, daß CD11b/CD18 für die Immigration in die Epidermis von besonderer Bedeutung zu sein scheint (von den Driesch 1993).

Die Bindung von Zytokin-stimulierten Granulozyten an die Basalmembran durch den CD11b/CD18-Rezeptor gilt als etabliert (Gammon et al. 1990). Dabei sind das TNF- α und andere Zytokine für die Hochregulation des Rezeptors verantwortlich. TNF- α scheint einen höheren stimulierenden Effekt zu haben, als IL-1 (Berger et al. 1988).

Die Frage, an welche Strukturen CD11b/CD18 bindet, wird kontrovers diskutiert.

Denkbar ist die einfache Funktion als Komplementrezeptor, aber auch eine Bedeutung als Zell-Zell-Adhäsionsligand. Anzunehmen ist, daß der zelluläre Gegenspieler ICAM-I an den basalen Keratinozyten exprimiert ist. Eine Zell-Zell-Adhäsion kann zusätzlich also durchaus postuliert werden.

Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, die Bedeutung des ICAM-I-Moleküls für die Adhäsion der Granulozyten beim bullösen Pemphigoid zu analysieren. Dabei würde sich eine Inhibition des ICAMs durch ICAM-Antikörper

anbieten, um die Folgen der Blockade im Granulozytenadhäsionsassay zu bestimmen. Diese Antikörper müßten allerdings Fab-fragmentiert sein, um eine Bindung über Fc-Rezeptoren zu verhindern.

4.1.6 Adhäsionsversuche mit IgG-depletiertem Serum

Immunglobuline binden an neutrophile Granulozyten über ihren Fc-Teil und den entsprechenden Fc-Rezeptor auf der granulozytären Oberfläche. Ebenso kann eine Bindung von Partikeln an Granulozyten vermittelt werden, indem die Partikel mit der Antigenbindungsstelle und die Fc-Teile mit den Granulozyten interagieren. Man unterscheidet drei Typen von Fc-Rezeptoren für IgG: Während der Fc- γ -I-Rezeptor (CD64) erst nach Stimulation mit INF- γ nachweisbar ist, werden der Fc- γ -II- (CD32) und Fc- γ -III-Rezeptor (CD16) permanent exprimiert. Die Interaktion von IgG mit den Fc-Rezeptoren mediiert eine Reihe biologischer Funktionen, wie die Freisetzung von Sauerstoffradikalen (Respiratory Burst) und die Freisetzung von Entzündungsmediatoren (INF- γ , TNF- α), sowie die Aktivierung der Antikörper-abhängigen Zelltoxizität und der granulozytären Phagozytose. Die Bedeutung der Immunglobuline in der Pathogenese des bullösen Pemphigoids besteht aber nicht nur in der Aktivierung von Granulozyten durch den Fc-Teil, sondern auch in der spezifischen Interaktion mit den Autoantigenen des bullösen Pemphigoids mit konsekutiver Induktion der subepidermalen Blasenbildung.

Um den Einfluß des IgG auf die Granulozytenadhäsion zu analysieren, wurde mit einer Protein A-Absorptionssäule das IgG aus dem BP-Serum entfernt. Nach Depletion des IgG wird eine signifikante Reduktion der Granulozytenbindung nachweisbar, unabhängig von der Zytokin-Aktivierung der Granulozyten. In Kontrollexperimenten unter Verwendung von Normalserum hatte eine IgG-Depletion ebenfalls eine reduzierte Adhäsion zur Folge. Allerdings fällt in den Kontrollexperimenten die Reduktion deutlich geringer aus, was für einen spezifischen Effekt der BP-Autoantikörper spricht.

Tatsächlich deuten eine Reihe von Beobachtungen auf eine wichtige pathogenetische Rolle des IgG hin. So fanden Gammon et al., daß die aus menschlichen Seren isolierten Autoantikörper im Vergleich zu IgG-depletierten Kontrollen eine erhöhte Leukozytenbindung hervorrufen können (Gammon et al. 1980). Im Mausmodell

wurden dermoepidermale Destruktionen mit Blasenbildung durch monoklonale Kaninchenantikörper hervorgerufen (Liu u. Diaz 2001). Dieses Modell ist allerdings nur bedingt auf den Menschen anwendbar, zum einen wegen der Verwendung von heterologen Antiseren, zum anderen wegen funktioneller Unterschiede des murinen BP180-Antigens. So gelang es nicht, die Generation von Bullae mit humanen Antikörpern zu induzieren. Erst durch die Verwendung von Kaninchen-anti-Maus-Seren konnte die Krankheitsentwicklung ausgelöst werden.

4.1.7 Effekte von Komplementfaktoren

In den hier beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, daß sich durch Zugabe der Komplementfaktoren C3, C4 und C5 eine Steigerung der Granulozytenadhäsion erreichen läßt. Dieser Effekt war bei aktivierten Granulozyten besonders ausgeprägt. Voraussetzung für diese Adhäsionssteigerung war allerdings die Zugabe von Serum von bullösen-Pemphigoid-Patienten. Bei Verwendung von Normalserum ließ sich durch Zugabe von Komplement nur eine deutlich geringere Adhäsionssteigerung beobachten.

Komplementfaktoren lagern sich an den Stellen im Gewebe ab, an denen sich bereits Antigen-Antikörper-Komplexe befinden (Ward 1971). Weiterhin findet man Komplementfaktoren im Serum und in der Blasenflüssigkeit von Patienten mit bullösem Pemphigoid, sowie biologisch aktive Komplementfragmente an den Orten Immunkomplex-medierter Gewebsschädigung (Ward u. Hill 1972). Es konnte ferner gezeigt werden, daß Tiere mit genetischem Defekt für die Bildung von Komplement oder experimentell induziertem Komplementdefekt eine wesentlich niedrigere Entzündungsaktivität im Vergleich zu Komplement-Normalen aufweisen (DeShazo et al. 1972; Ward u. Hill 1972).

Ein weiterer Hinweis auf die lokale Komplementaktivierung bei Autoimmunerkrankungen ergibt sich aus der Tatsache, daß diese Patienten Komponenten des klassischen und alternativen Komplementaktivierungswegs, sowie Regulationsproteine des Komplements im befallenen Gewebe aufweisen. Im Blasenfluid lassen sich Komplement-abhängige chemotaktische Aktivitäten (wahrscheinlich C5a), Komplementspaltprodukte und Komplementfaktoren nachweisen (Jordon et al. 1969).

Mechanismen, mit denen die Komplementaktivierungen die Granulozyten beeinflussen und so zur Gewebsentzündung und zum Zellschaden beitragen, sind jedoch nicht vollständig verstanden. Bekannterweise führt die Produktion von chemotaktischen Faktoren und die Aktivierung von Komplement zur Stimulation von Granulozyten und zur Opsonierung. Aus in vitro-Studien weiß man, daß Komplement-besetzte Strukturen von Granulozyten besser erkannt werden können und die Interaktionen zwischen Zellen und Komplement zur Steigerung der Phagozytose und Produktion lysosomaler Enzyme führt (Henson 1976). Diese Interaktion wird auf Seiten der Granulozyten durch deren Komplement-Rezeptoren vermittelt.

Folglich ergaben Granulozytenadhäsionsversuche mit Komplement-defizienten Seren signifikant verminderte Zellbindungen (Gammon et al. 1980; Gupta et al. 1991). Mittels eines Tiermodells ließ sich ferner zeigen, daß Komplement für die Entwicklung struktureller Gewebsalterationen unerlässlich ist und C5-defiziente Mäuse folglich kein bullöses Pemphigoid analog entwickeln (Liu et al. 1995).

Aufgrund dieser Erkenntnislage und auch unseren Experimenten läßt sich die Hypothese erhärten, daß Komplementfaktoren tatsächlich eine Rolle in der Pathogenese der Blasenbildung spielen.

4.2 Einfluß von Medikamenten im Adhäsionsassay

4.2.1 Experimentelle Mycophenolat Mofetil-Konzentrationen

Bei den Untersuchungen über den Einfluß von Mycophenolat Mofetil (MMF) auf das Adhäsionsverhalten der Granulozyten war die Wahl der zu testenden MMF-Konzentrationen zu klären. In der vorliegenden Studie wurde mit MMF-Verdünnungen zwischen 1µg und 1mg/ml gearbeitet, um das Wirkungsoptimum herauszufinden. Der große Dosierungsspielraum wurde gewählt, da bisher noch keine Versuche mit MMF in Granulozytenadhäsionsassays vorlagen. In der Literatur finden sich verschiedene Modelle, bei denen MMF an Granulozyten, Lymphozyten und anderen Zellen unter wechselnden Versuchsbedingungen getestet wurde (Allison

u. Eugui 1993, Blaheta et al. 1998). Diese ließen wegen unterschiedlichen Designs keine Rückschlüsse auf Konzentrationsoptima im Adhäsionsassay zu.

Bei einem Vergleich zwischen den gemessenen Plasmaspiegeln und den experimentell eingesetzten MMF-Konzentrationen fällt auf, daß die in vitro-Applikationen 10x bis 1000x höher liegen als die in vivo erzielten Plasmakonzentrationen nach therapeutischer Gabe. Da man von einer pharmakologischen Akkumulation im entzündeten Gewebe ausgehen kann, ist die Übertragung dieses in vitro nachgewiesenen Effektes auf die klinische Situation vermutlich dennoch plausibel. Bei den in der Literatur beschriebenen Experimenten, die eine Wirkung auf Lymphozyten nachgewiesen haben, lagen die erforderlichen Konzentrationen von MMF im Bereich von $1\mu\text{M}/\text{ml}$ bis $100\mu\text{M}/\text{ml}$ ($0,0025\mu\text{g}$ bis $0,25\mu\text{g}/\text{ml}$) (Blaheta et al. 1998). Andere Autoren fanden in Versuchen mit T- und B-Lymphozyten ein Wirkungsmaximum im Bereich unter $0,1\mu\text{g}/\text{ml}$ (Allison u. Eugui 1993) bei Experimenten mit Granulozyten, nicht aber bei Lymphozyten und Monozyten. Bei diesen zeigten sich im Dosisbereich bis zu $10\mu\text{M}/\text{ml}$ keine Effekte (Allison u. Eugui, 1993). Von anderen Arbeitsgruppen wurde MMF, um die Wirkung auf Lymphozyten (Blaheta et al. 1998), speziell T- und B-Lymphozyten (Allison u. Eugui 1993) zu ermitteln, in einem sehr breiten Konzentrationsbereich eingesetzt. Diese experimentellen Beobachtungen führten dazu, daß in den vorliegenden Experimenten der Einfluß von MMF auf die Granulozytenadhäsion in dem Bereich von $1\mu\text{g}$ bis 1mg analysiert wurde, da auch dies klinisch therapeutisch geltenden Serumspiegel hinreichend berücksichtigt.

4.2.2 Mycophenolat Mofetil im Granulozytenadhäsionsassay

Bei den hier beschriebene Experimenten wurde deutlich, daß eine Vorinkubation der neutrophilen Granulozyten mit MMF eine dosisunabhängige Reduktion der TNF- α -induzierten Zelladhäsion bewirkt. Da vergleichbare Experimente über die Wirkung von MMF im bullösen Pemphigoid-Modell nicht zur Verfügung stehen, wurden analoge Experimente mit anderen Zelltypen herangezogen, um diese Beobachtungen zu unterstützen und zu interpretieren. Neben der selektiven Hemmung der Lymphozyten-Proliferation (Allison u. Eugui 1991) konnte ein Adhäsionshemmender Effekt von MMF in mehreren experimentellen Arbeiten etabliert werden

(Blaheta et al. 1998; Blaheta et al. 1999; Eugui et al. 1991; Morris et al. 1990; Morris 1991). Für diese Wirkung verantwortlich scheint die Herunterregulation der IL1-induzierten E-Selektin-, ICAM-1- und VCAM-1-Synthese zu sein (Blaheta et al. 1994; Blaheta et al. 1998). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß die Biosynthese-Rate für CD11a herabgesetzt wird (Blaheta et al. 1998). Es ist unklar, in wie weit diese Regulation der Zellinteraktion zwischen Granulozyten und Endothel durch Adhäsionsmoleküle auf das hier verwendete Adhäsionsassay übertragbar ist, da sich die Rezeptoren epidermaler Zellen von denen der Endothelien wesentlich unterscheiden. Ein Unterschied ergibt sich aus der fehlenden Expression von Liganden für L-Selektine auf Epidermiszellen, so daß die hinreichend etablierte Beeinflussung der L-Selektin-Hemmung durch MMF für dessen Effekte im hier benutzten Adhäsionsassay nicht verantwortlich sein dürfte.

In den hier vorliegenden Experimenten konnte gezeigt werden, daß MMF Einfluß auf das Adhäsionsverhalten der Granulozyten nimmt, auch wenn diese mit dem Phospholipidmediator PAF stimuliert sind. Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen von Asako et al. über das mesenteriale ‘Homing‘ von leukozytären Zellen (Asako et al. 1992).

Da die hier diskutierten Beobachtungen auch im klinisch-therapeutischen Bereich von MMF eine Hemmung der Adhäsion bewirken, kann spekuliert werden, daß den hier nachgewiesenen Effekten in vivo ebenfalls eine Bedeutung zukommen könnte.

Bei der PAF-Bindungsstelle handelt es sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der über Aktivierung verschiedener Enzyme (unter anderem einer Tyrosinkinase) an der Signaltransduktion beteiligt ist. Der Ansatzpunkt des MMF liegt vermutlich in der Inhibierung der Phosphorylierung von zytoplasmatischen Rezeptoranteilen, wodurch die Aktivierung von Adhäsionsmolekülen gehemmt und der Vorgang der Signaltransduktion unterbrochen wird.

4.2.3 Cyclosporin A im Granulozytenadhäsionsassay

In den hier dargestellten Experimenten zeigt Cyclosporin A einen signifikanten Effekt im Adhäsionsassay, indem eine Inhibition der Adhäsion nachweisbar ist und

zwar in einer ähnlichen Größenordnung wie bei MMF. Eine experimentelle Untersuchung der Beeinflussung der Adhäsion von Granulozyten an epidermale Epitope durch Cyclosporin A steht bisher noch aus. So gibt es keine weiteren experimentellen Hinweise, welche molekularen Abläufe beeinflusst werden können und welche Epitope als Ansatzpunkt für die inhibitorische Wirkung des Cyclosporin A verantwortlich sind.

Die entscheidenden biologischen Effekte von Cyclosporin A wurden im Hinblick auf die Funktion von Lymphozyten, bzw. T-Zellen, beschrieben. Das bessere Verständnis der Funktionsweise des Cyclosporin A und seiner Beeinflussung der Signalkaskade erlaubt aber, bis zu einem gewissen Grade, auch eine Übertragung auf die Funktionsverhältnisse granulozytärer Zellen. Es finden sich nämlich zunehmend Hinweise darauf, daß eine Modulation von Zelloberflächenstrukturen, wie zum Beispiel der β 2-Intergrine, i.e. die regulative Veränderung des CD18-Phänotyps, auch auf granulozytären Zellen stattfindet (Scavuzzo et al. 2001; Thivolet et al. 1985) und man somit vermutlich von analogen Prozessen ausgehen kann.

Cyclosporin A, das nicht nur in der Organtransplantation, sondern auch zur Behandlung des bullösen Pemphigoids Verwendung findet, beeinflusst die frühe Phase der T-Zell-Aktivierung und hemmt die Interaktion zwischen Antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen bzw. dendritischen Zellen) und T-Zellen. Der zugrunde liegende Wirkmechanismus ist die Beeinflussung der Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors, indem die Proteinkinase C β gehemmt und die Induktion der nukleären Komponente des Nuclear Factors-AT verhindert wird (Britton und Palazios 1982; Shevach 1985). Auf zellulärer Ebene werden die Cyclosporin-Effekte im Wesentlichen über Cyclophilin und Calmodulin vermittelt, beides Proteine, die nicht nur in Lymphozyten, sondern auch auf anderen Zelltypen, i.e. Keratinozyten, exprimiert sind. Vermutlich wird man von sehr viel umfassenderen Effekten des Cyclosporin A auf zelluläre Interaktionen auszugehen haben, die die oben beschriebenen experimentellen Beobachtungen zu erklären im Stande sind.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit evaluierte ein Granulozytenadhäsionsassay, das die Pathogenese des bullösen Pemphigoids experimentell rekonstruiert und analysierte die für die Ausbildung der Bullae verantwortlichen Faktoren. Als vermutlich pathogenetisch relevante Einflußgrößen wurden die Immunglobulin G-Fraktion der Patientenseren, Entzündungsmediatoren, sowie exemplarisch ein Adhäsionsmolekül getestet. Darüber hinaus wurden die Effekte von Immunsuppressiva, die in der Therapie des bullösen Pemphigoids Verwendung finden, im Adhäsionsassay untersucht.

In dem hier benutzten Adhäsionsassay fanden Kryostatschnitte normaler Haut und im Dichtegradienten isolierte neutrophile Granulozyten Verwendung. Die Granulozyten wurden in einem Teil der Experimente mit TNF- α und PAF, die Kryostatschnitte mit Patienten- bzw. Kontrollseren vorinkubiert. In weiteren Experimenten wurde die Adhäsion in Anwesenheit von CD11b-Inhibitoren, den Komplementfaktoren C3, C4, C5 und Immunglobulin G-depletierten Seren gemessen. Darüber hinaus fand eine Vorinkubation aktivierter Granulozyten mit den Medikamenten Mycophenolat Mofetil und Cyclosporin A statt. Die prozessierten Kryostatschnitte wurden neben der quantitativen Erfassung der Adhäsion im Lichtmikroskop auf lytische Bereiche an der Basalmembran untersucht.

Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid induzierten ebenso wie die Komplementfaktoren C3, C4 und C5 eine vermehrte Neutrophilenadhäsion an der epidermalen Basalmembran. Eine Hemmung der Neutrophilenadhäsion wurde durch CD11b-Inhibition sowie eine Immunglobulin-G-Depletion der Patientenseren bewirkt. Mycophenolat Mofetil und Cyclosporin A inhibierten ebenfalls die Adhäsion von Granulozyten an epidermalen Strukturen. Im Bereich der Granulozytenadhäsion konnten Spaltbildungen nachgewiesen werden, die an ein bullöses Pemphigoid erinnerten.

Die vorliegenden Experimente zeigten, daß Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an die Basalmembran steigern. Dieser Prozess wurde offenbar durch Immunglobulin G, CD11b und die Komplementfaktoren C3 bis C5 propagiert. Die Hemmung von CD11b auf den

Granulozyten führte zu einer Inhibition der Adhäsion. Auch für die in der Therapie des bullösen Pemphigoids verwendete Pharmaka Mycophenolat Mofetil und Cyclosporin A konnte erstmals gezeigt werden, daß sie diese Adhäsion tatsächlich hemmen. Das verwendete recht einfache humane Modell erscheint geeignet, die molekulare Pathogenese des bullösen Pemphigoids zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

Albelda SM, Buck CA (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 4: 2868-2880

Aleksandrovskii I (1988) The role of inhibitors of the complement activation system in the pathogenesis and therapy of insulin-dependent diabetes mellitus (review). *Vopr Med Khim* 34: 7-15

Allen JN, Herzyk DJ, Wewers MD (1991) Colchicine has opposite effects on interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha production. *Am J Physiol* 261: L315-L321

Allison AC, Eugui EM (1991) Immunosuppressive and long-acting anti-inflammatory activity of mycophenolic acid and derivative, RS-61443. *Br J Rheumatol* 30 Suppl 2: 57-61

Allison AC, Eugui EM (1993) Immunosuppressive and other effects of Mycophenolic Acid and an ester prodrug, Mycophenolate Mofetil. *Immunol Rev* 136:4-29

Allison AC, Eugui EM (1993) The design and development of an immunosuppressive drug, mycophenolate mofetil. *Springer Semin Immunopathol* 14: 353-380

Allison AC, Hovi T, Watts RW, Webster AD (1975) Immunological observations on patients with Lesch-Nyhan syndrome, and on the role of de-novo purine synthesis in lymphocyte transformation. *Lancet* 2: 1179-1183

Allison AC, Kowalski WJ, Muller CJ, Waters RV et al (1993) Mycophenolic acid and brequinar, inhibitors of purine and pyrimidine synthesis, block the glycosylation of adhesion molecules. *Transplant Proc* 25: 67-70

Anderson DC, Springer TA (1987) Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Annu Rev Med* 38: 175-194

Antonioli JA, Vannotti A (1967) The metabolism of granulocytes in inflammation. *Schweiz Med Wochenschr* 97: 113-123

Aoki Y, Yokoyama T, Chiyoda S (1980) Proteases in granulocytes (author' s transl). *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 25: 463-471

Arnaut MA (1990) Leukocyte adhesion molecules deficiency: its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response. *Immunol Rev* 114: 145-180

Arnaut MA (1990) Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 75: 1037-1050

Arnaut MA, Todd RF, III, Dana N, Melamed J et al (1983) Inhibition of phagocytosis of complement C3 - or immunoglobulin G-coated particles and of C3bi binding by monoclonal antibodies to a monocyte- granulocyte membrane glycoprotein (Mol). *J Clin Invest* 72: 171-179

Asako H, Kubes P, Baethge BA, Wolf RE et al (1992) Colchicine and methotrexate reduce leukocyte adherence and emigration in rat mesenteric venules. *Inflammation* 16: 45-56

Baadsgaard O, Fisher GJ, Voorhees JJ, Cooper KD (1990) Interactions of epidermal cells and T cells in inflammatory skin diseases. *J Am Acad Dermatol* 23: 1312-1316

Barabe F, Gilbert C, Liao N, Bourgoin SG et al (1998) Crystal-induced neutrophil activation VI. Involvement of FcγRIIIB (CD16) and CD11b in response to inflammatory microcrystals. *FASEB J* 12: 209-220

Barker JNWN, Groves RW, Allen MH, MacDonald DM (1992) Preferential adherence of T lymphocytes and neutrophils to psoriatic epidermis. *Br J Dermatol* 127: 205-211

Barthelemy H, Frappaz A, Cambazard F, Mauduit G et al (1988) Treatment of nine cases of pemphigus vulgaris with cyclosporine. *J Am Acad Dermatol* 18: 1262-1266

Bauer-Sic P (1965) Cytochemistry of neutrophil granulocytes. Zentralbl Veterinarmed A 12: 365-379

Beller DI, Springer TA, Schreiber RD (1982) Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. J Exp Med 156: 1000-1009

Benveniste J, Henson PM, Cochrane CG (1972) Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. J Exp Med 136: 1356-1377

Berger M, Wetzler EM, Wallis RS (1988) Tumor necrosis factor is the major monocyte product that increases complement receptor expression on mature human neutrophils. Blood 71: 151-158

Berton G, Fumagalli L, Laudanna C, Sorio C (1994) Beta 2 integrin-dependent protein tyrosine phosphorylation and activation of the FGR protein tyrosine kinase in human neutrophils. J Cell Biol 126: 1111-1121

Beutner EH, Jordon RE, Chorzelski TP (1968) The immunopathology of pemphigus and bullous pemphigoid. J Invest Dermatol 51: 63-80

Blaheta RA, Leckel K, Oppermann E et al (1998) Influence of Mycophenolate Mofetil (CellCept®) on Lymphocytic Adhesion Receptors in vitro. Tx Med 10:74-78

Blaheta RA, Leckel K, Wittig B, Zenker D et al (1998) Inhibition of endothelial receptor expression and of T-cell ligand activity by mycophenolate mofetil. Transpl Immunol 6: 251-259

Blaheta RA, Leckel K, Wittig B, Zenker D et al (1999) Mycophenolate mofetil impairs transendothelial migration of allogeneic CD4 and CD8 T-cells. Transplant Proc 31: 1250-1252

Blaheta RA, Scholz M, Hailer NP, Bereiter-Hahn J et al (1994) Adhesion and penetration properties of human lymphocytes acting on allogeneic vascular endothelial cells. Immunology 81: 538-545

Bloemen PG, Van den Tweel MC, Henricks PA, Engels F et al (1996) Stimulation of both human bronchial epithelium and neutrophils is needed for maximal interactive adhesion. *Am J Physiol* 270: L80-L87

Bohm M, Beissert S, Schwarz T, Metze D et al (1997) Bullous pemphigoid treated with mycophenolate mofetil. *Lancet* 22; 349 (9051): 541

Borregaard N (1996) Cellular biology of neutrophil granulocytes. *Ugeskr Laeger* 158: 3908-3912

Bremm KD, Konig W (1988) Role of neutrophilic granulocytes in the defense against microbial infection. Signal transmission and the release of pro-inflammatory mediators. *Dtsch Med Wochenschr* 113: 392-402

Britton S, Palacios R (1982) Cyclosporin A - usefulness, risks and mechanism of action. *Immunol Rev* 65: 5-22

Brown EJ, Lindberg FP (1996) Leucocyte adhesion molecules in host defence against infection. *Ann Med* 28: 201-208

Bruninga GL (1971) Complement - a review of the chemistry and reaction mechanisms. *Am J Clin Pathol* 55: 273-282

Bullingham R, Monroe S, Nicholls A, Hale M (1996) Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol* 36: 315-324

Bullingham RE, Nicholls A, Hale M (1996) Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil (RS61443): a short review. *Transplant Proc* 28: 925-929

Buyon JP, Slade SG, Reibman J, Abramson SB et al (1990) Constitutive and induced phosphorylation of the alpha- and beta-chains of the CD11/CD18 leukocyte integrin family. Relationship to adhesion - dependent functions. *J Immunol* 144: 191-197

Camussi G, Tetta C, Bussolino F, Caligaris CF et al (1981) Mediators of immune-complex-induced aggregation of polymorphonuclear neutrophils. Platelet-activating factor as the effector substance of immune-induced aggregation. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 64: 25-41

Chin YH, Falanga V, Taylor JR, Cai JP et al (1990) Adherence of human helper/memory T-cell subsets to psoriatic dermal endothelium. *J Invest Dermatol* 94: 413-417

Colombani PM, Robb A, Hess AD (1985) Cyclosporin A binding to calmodulin: a possible site of action on T lymphocytes. *Science* 228: 337-339

Cooper KD, Voorhees JJ, Fisher GJ, Chan LS et al (1990) Effects of cyclosporine on immunologic mechanisms in psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 23: 1318-1326

Crockett-Torabi E, Sulenbarger B, Smith CW, Fantone JC (1995) Activation of human neutrophils through L-selectin and Mac-1 molecules. *J Immunol* 154: 2291-2302

Curley RK, Holden CA (1991) Steroid-resistant bullous pemphigoid treated with cyclosporin A. *Clin Exp Dermatol* 16: 68-69

Davignon D, Martz E, Reynolds T, Kurzinger K et al (1981) Monoclonal antibody to a novel lymphocyte function-associated antigen (LFA-1): mechanism of blockade of T lymphocyte-mediated killing and effects on other T and B lymphocyte functions. *J Immunol* 127: 590-595

De Panfilis G, Soligo D, Manara GC, Ferrari C et al (1989) Adhesion molecules on the plasma membrane of epidermal cells. I. Human resting Langerhans cells express two members of the adherence-promoting CD11/CD18 family, namely, H-Mac-1 (CD11b/CD18) and gp 150,95 (CD11c/CD18). *J Invest Dermatol* 93: 60-69

Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ (1979) Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J Biol Chem* 254: 9355-9358

DeShazo CV, Henson PM, Cochrane CG (1972) Acute immunologic arthritis in rabbits. *J Clin Invest* 51: 50-57

Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA (1991) Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* 65: 961-971

Eisen D, Ellis CN (1990) Topical cyclosporine for oral mucosal disorders. *J Am Acad Dermatol* 23: 1259-1263

Eugui EM, Almquist SJ, Muller CD, Allison AC (1991) Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. *Scand J Immunol* 33: 161-173

Eugui EM, Mirkovich A, Allison AC (1991) Lymphocyte-selective antiproliferative and immunosuppressive activity of mycophenolic acid and its morpholinoethyl ester (RS-61443) in rodents. *Transplant Proc* 23: 15-18

Forsyth KD, Levinsky RJ (1990) Preparative procedures of cooling and re-warming increase leukocyte integrin expression and function on neutrophils. *J Immunol Methods* 128: 159-163

Frank MM (1989) Complement: a brief review. *J Allergy Clin Immunol* 84: 411-420

Fritsch PO (1998) *Dermatologie Venerologie*, 1. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York

Fulton B, Markham A (1996) Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs* 51: 278-298

Fuortes M, Jin WW, Nathan C (1994) Beta 2 integrin-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin in human neutrophils treated with tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 127: 1477-1483

Gammon WR, Hendrix JD, Mangum K, Jeffes EW (1990) Recombinant human cytokines stimulate neutrophil adherence to IgG autoantibody-treated epithelial basement membranes. *J Invest Dermatol* 95: 164-171

Gammon WR, Lewis DM, Carlo JR, Sams WM, Jr. et al (1980) Pemphigoid antibody mediated attachment of peripheral blood leukocytes at the dermal-epidermal junction of human skin. *J Invest Dermatol* 75: 334-339

Gammon WR, Merritt CC, Lewis DM, Sams WM, Jr. et al (1981) Leukocyte chemotaxis to the dermal-epidermal junction of human skin mediated by pemphigoid antibody and complement: mechanism of cell attachment in the in vitro leukocyte attachment method. *J Invest Dermatol* 76: 514-522

Garcia-Gonzalez E, Swerlick RA, Lawley TJ (1990) Cell adhesion molecules. *Am J Dermatopathol* 12: 188-192

Georgi M, Jainta S, Brocker EB, Zillikens D (2001) Autoantigens of subepidermal bullous autoimmune dermatoses. *Hautarzt* 52: 1079-1090.

Glasser L (1982) Liquid storage of granulocytes. *Prog Clin Biol Res* 88: 31-41

Graham IL, Anderson DC, Holers VM, Brown EJ (1994) Complement receptor 3 (CR3, Mac-1, integrin alpha M beta 2, CD11b/CD18) is required for tyrosine phosphorylation of paxillin in adherent and nonadherent neutrophils. *J Cell Biol* 127: 1139-1147

Griffiths CE, Voorhees JJ, Nickoloff BJ (1989) Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor. *J Am Acad Dermatol* 20: 617-629

Gruschwitz M, von den Driesch P, Kellner I, Hornstein OP et al (1992) Expression of adhesion proteins involved in cell-cell and cell-matrix interactions in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 27: 169-177

Gupta AK, Rocher LL, Schmaltz SP, Goldfarb MT et al (1991) Short-term changes in renal function, blood pressure, and electrolyte levels in patients receiving cyclosporine for dermatologic disorders. *Arch Intern Med* 151: 356-362

Halloran PF (1996) Molecular mechanisms of new immunosuppressants. *Clin Transplant* 10: 118-123

Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ et al (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226: 544-547

Haslett C, Guthrie LA, Kopaniak MM, Johnston RB, Jr. et al (1985) Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol* 119: 101-110

Haustein UF, Lohrisch I, Herrmann K (1980) On the autoimmune pathogenesis of bullous pemphigoid. Review of the literature and our results (author' s transl). *Dermatol Monatsschr* 166: 585-598

Hemler ME (1988) Adhesive protein receptors on hematopoietic cells. *Immunol Today* 9: 109-113

Henson PM (1976) Membrane receptors on neutrophils. *Immunol Commun* 5: 757-774

Hess AD, Esa AH, Colombani PM (1988) Mechanisms of action of cyclosporine: effect on cells of the immune system and on subcellular events in T cell activation. *Transplant Proc* 20: 29-40

Hibbs ML, Xu H, Stacker SA, Springer TA (1991) Regulation of adhesion of ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-1 integrin beta subunit. *Science* 251: 1611-1613

Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, Kang AH et al (1985) Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 260: 2493-2500

Hirako Y, Usukura J, Uematsu J, Hashimoto T et al (1998) Cleavage of BP180, a 180-kDa bullous pemphigoid antigen, yields a 120-kDa collagenous extracellular polypeptide. *J Biol Chem* 273: 9711-9717

Holt DW, Johnston A, Marsden JT, Vernillet L et al (1988) Monoclonal antibodies for radioimmunoassay of cyclosporine: a multicenter comparison of their performance with the Sandoz polyclonal radioimmunoassay kit. *Clin Chem* 34: 1091-1096

Hopken UE, Lu B, Gerard NP, Gerard C (1997) Impaired inflammatory responses in the reverse arthus reaction through genetic deletion of the C5a receptor. *J Exp Med* 186: 749-756

Imber MJ, Murphy GF, Jordon RE (1987) The immunopathology of bullous pemphigoid. *Clin Dermatol* 5: 81-92

Ina K, Kusugami K, Shimada M, Tsuzuki T et al (2002) Suppressive effects of cyclosporine A on neutrophils and T cells may be related to therapeutic benefits in patients with steroid-resistant ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 8: 1-9

Ingraham LM, Coates TD, Allen JM, Higgins CP et al (1982) Metabolic, membrane, and functional responses of human polymorphonuclear leukocytes to platelet-activating factor. *Blood* 59: 1259-1266

Isobe M, Yagita H, Okumura K, Ihara A (1992) Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science* 255: 1125-1127

Isolauri E, Pelto L, Nuutila J, Majamaa H et al (1997) Altered expression of IgG and complement receptors indicates a significant role of phagocytes in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 99: 707-713

Jaeger K, Ruschulte H, Heine J, Scheinichen D et al (2000) Neutrophils respiratory burst is not impaired under cyclosporine treatment following liver transplantation. *Transplantation* 69: 1752-1753

Jordon RE, Beutner EH, Witebsky E, Blumental G et al (1967) Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. *JAMA* 200: 751-756

Jordon RE, Bushkell LL (1979) The complement system in pemphigus, bullous pemphigoid and herpes gestationis. *Int J Dermatol* 18: 271-281

Jordon RE, Sams WM, Jr., Beutner EH (1969) Complement immunofluorescent staining in bullous pemphigoid. *J Lab Clin Med* 74: 548-556

Kahan BD (1989) Cyclosporine. *N Engl J Med* 321: 1725-1738

Kapp A, Zeck-Kapp G (1990) Activation of the oxidative metabolism in human polymorphonuclear neutrophilic granulocytes: the role of immuno-modulating cytokines. *J Invest Dermatol* 95: 94S-99S

Katayama H, Hase T, Yaoita H (1994) Detachment of cultured normal human keratinocytes by contact with TNF alpha-stimulated neutrophils in the presence of platelet-activating factor. *J Invest Dermatol* 103: 187-190

Katz AM, Rosenthal D, Sauder DN (1991) Cell adhesion molecules. Structure, function, and implication in a variety of cutaneous and other pathologic conditions. *Int J Dermatol* 30: 153-160

Keizer GD, Te Velde AA, Schwarting R, Figdor CG et al (1987) Role of p150,95 in adhesion, migration, chemotaxis and phagocytosis of human monocytes. *Eur J Immunol* 17: 1317-1322

Keller HU, Zimmermann A (1987) Shape, movement and function of neutrophil granulocytes. *Biomed Pharmacother* 41: 285-289

Kelly SE, Wojnarowska F (1988) The use of chemically split tissue in the detection of circulating anti-basement membrane zone antibodies in bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid. *Br J Dermatol* 118: 31-40

Kippes W, Schmidt E, Roth A, Rzany B et al (1999) Immunopathologic changes in 115 patients with bullous pemphigoid. *Hautarzt* 50: 866-872

Kishimoto TK, Larson RS, Corbi AL, Dustin ML et al (1989) The leukocyte integrins. *Adv Immunol* 46: 149-182

Kishimoto TK, O' Connor K, Lee A, Roberts TM et al (1987) Cloning of the beta subunit of the leukocyte adhesion proteins: homology to an extracellular matrix receptor defines a novel supergene family. *Cell* 48: 681-690

Kondo S, Sauder DN (1997) Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p55) is a main mediator for TNF-alpha-induced skin inflammation. *Eur J Immunol* 27: 1713-1718

Konter U, Kellner I, Hoffmeister B, Sterry W (1990) Induction and upregulation of adhesion receptors in oral and dermal lichen planus. *J Oral Pathol Med* 19: 459-463

Konter U, Kellner I, Klein E, Kaufmann R et al (1989) Adhesion molecule mapping in normal human skin. *Arch Dermatol Res* 281: 454-462

Korman N (1987) Bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 16: 907-924

Korman NJ (1998) Bullous pemphigoid. The latest in diagnosis, prognosis, and therapy. *Arch Dermatol* 134: 1137-1141

Kuijpers TW, Tool AT, van der Schoot CE, Ginsel LA et al (1991) Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. *Blood* 78: 1105-1111

Kunzendorf U, Walz G, Brockmoeller J, Neumayer HH et al (1991) Effects of diltiazem upon metabolism and immunosuppressive action of cyclosporine in kidney graft recipients. *Transplantation* 52: 280-284

Lange WG, Ralfkiaer E, Lisby S, Rothlein R (1988) The role of intercellular adhesion molecules in inflammatory skin reactions. *Br J Dermatol* 119: 141-145

Larrick JW, Graham D, Toy K, Lin LS et al (1987) Recombinant tumor necrosis factor causes activation of human granulocytes. *Blood* 69: 640-644

Larson RS, Springer TA (1990) Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* 114: 181-217

Lasky LA (1992) Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 258: 964-969

Launay P, Lehuen A, Kawakami T, Blank U et al (1998) IgA Fc receptor (CD89) activation enables coupling to syk and Btk tyrosine kinase pathways: differential signaling after IFN-gamma or phorbol ester stimulation. *J Leukoc Biol* 63: 636-642

Laurent AF, Dumont S, Poindron P, Muller CD (1996) Mycophenolic acid suppresses protein N-linked glycosylation in human monocytes and their adhesion to endothelial cells and to some substrates. *Exp Hematol* 24: 59-67

Lawrence MB, Springer TA (1991) Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65: 859-873

Lee WA, Gu L, Miksztal AR, Chu N et al (1990) Bioavailability improvement of mycophenolic acid through amino ester derivatization. *Pharm Res* 7: 161-166

Leigh LE, Ghebrehiwet B, Perera TP, Bird IN et al (1998) C1q-mediated chemotaxis by human neutrophils: involvement of gC1qR and G-protein signalling mechanisms. *Biochem J* 330 (Pt 1): 247-254

Limb GA, Hamblin AS, Wolstencroft RA, Dumonde DC (1991) Selective up-regulation of human granulocyte integrins and complement receptor 1 by cytokines. *Immunology* 74: 696-702

Lisby S, Ralfkiaer E, Rothlein R, Vejlsgaard GL (1989) Intercellular adhesion molecule-I (ICAM-I) expression correlated to inflammation. *Br J Dermatol* 120: 479-484

Liu Z, Diaz LA (2001) Bullous pemphigoid: end of the century overview. *J Dermatol* 28: 647-650

Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF et al (1993) A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest* 92: 2480-2488

Liu Z, Giudice GJ, Swartz SJ, Fairley JA et al (1995) The role of complement in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 95: 1539-1544

Liu Z, Giudice GJ, Zhou X, Swartz SJ et al (1997) A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 100: 1256-1263

Liu Z, Shapiro SD, Zhou X, Twining SS et al (2000) A critical role for neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 105: 113-123

Liu Z, Shipley JM, Vu TH, Zhou X et al (1998) Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid. *J Exp Med* 188: 475-482

Lo SK, Detmers PA, Levin SM, Wright SD (1989) Transient adhesion of neutrophils to endothelium. *J Exp Med* 169: 1779-1793

Loos M (1985) Bacteria and complement - a historical review. *Curr Top Microbiol Immunol* 121: 1-5

Luger T (2001) Treatment of immune-mediated skin diseases: future perspectives. *Eur J Dermatol* 11: 343-347

Macey MG, McCarthy DA, Vordermeier S, Newland AC et al (1995) Effects of cell purification methods on CD11b and L-selectin expression as well as the adherence and activation of leucocytes. *J Immunol Methods* 181: 211-219

Marlin SD, Morton CC, Anderson DC, Springer TA (1986) LFA-1 immunodeficiency disease. Definition of the genetic defect and chromosomal mapping of alpha and beta subunits of the lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) by complementation in hybrid cells. *J Exp Med* 164: 855-867

Martin U, Bock D, Arseniev L, Tornetta MA et al (1997) The human C3a receptor is expressed on neutrophils and monocytes, but not on B or T lymphocytes. *J Exp Med* 186: 199-207

Martynova VA, Golosova TV (1989) The state of the complement system in infectious and neoplastic processes (review of the literature). *Lab Delo* 2: 4-9

Masunaga T, Shimizu H, Yee C, Borradori L et al (1997) The extracellular domain of BPAG2 localizes to anchoring filaments and its carboxyl terminus extends to the lamina densa of normal human epidermal basement membrane. *J Invest Dermatol* 109: 200-206

Mavrakos TE (1989) Biology of granulocytes: differentiation, maturation, function, products. *Odontostomatol Proodos* 43: 487-494

May AE, Kanse SM, Lund LR, Gisler RH et al (1998) Urokinase receptor (CD87) regulates leukocyte recruitment via beta 2 integrins in vivo. *J Exp Med* 188: 1029-1037

McCarthy DA, Macey MG (1993) A simple flow cytometric procedure for the determination of surface antigens on unfixed leucocytes in whole blood. *J Immunol Methods* 163: 155-160

Merrill JT, Slade SG, Weissmann G, Winchester R et al (1990) Two pathways of CD11b/CD18-mediated neutrophil aggregation with different involvement of protein kinase C-dependent phosphorylation. *J Immunol* 145: 2608-2615

Messner RP, Jelinek J (1970) Receptors for human gamma G globulin on human neutrophils. *J Clin Invest* 49: 2165-2171

Morel P, Sohier J, Peltier AP, Cottenot F et al (1977) Lupus erythematosus and hereditary lack of complement. Review of about one case of C2 deficit (author' s transl). *Ann Dermatol Venereol* 104: 831-839

Morris RE, Hoyt EG, Murphy MP, Eugui EM et al (1990) Mycophenolic acid morpholinoethylester (RS-61443) is a new immunosuppressant that prevents and halts heart allograft rejection by selective inhibition of T- and B-cell purine synthesis. *Transplant Proc* 22: 1659-1662

Morris RE, Wang J, Blum JR, Flavin T et al (1991) Immunosuppressive effects of the morpholinoethyl ester of mycophenolic acid (RS-61443) in rat and nonhuman primate recipients of heart allografts. *Transplant Proc* 23: 19-25

Naccache PH, Jean N, Liao NW, Bator JM et al (1994) Regulation of stimulated integrin surface expression in human neutrophils by tyrosine phosphorylation. *Blood* 84: 616-624

Neuber K, Schwartz I, Itschert G, Dieck AT (2000) Treatment of atopic eczema with oral mycophenolate mofetil. *Br J Dermatol* 143: 385-391

Nickoloff BJ, Griffiths CE (1989) T lymphocytes and monocytes bind to keratinocytes in frozen sections of biopsy specimens of normal skin treated with gamma interferon. *J Am Acad Dermatol* 20: 736-743.

Nielsen OH, Bukhave K, Ahnfelt-Ronne I, Elmgreen J (1986) Arachidonic acid metabolism in human neutrophils: lack of effect of cyclosporine A. *Int J Immunopharmacol* 8: 419-426

Nousari HC, Sragovich A, Kimyai-Asadi A, Orlinsky D et al (1999) Mycophenolate mofetil in autoimmune and inflammatory skin disorders. *J Am Acad Dermatol* 40: 265-268

Oberyszyn TM, Conti CJ, Ross MS, Oberyszyn AS et al (1998) Beta2 integrin/ICAM-1 adhesion molecule interactions in cutaneous inflammation and tumor promotion. *Carcinogenesis* 19: 445-455

Odeberg H, Olofsson T, Olsson I (1973) Role of granulocytes in the defense against infection. *Lakartidningen* 70: 3141-3147

Ohsaka A, Saionji K, Igari J, Watanabe N et al (1997) Altered surface expression of effector cell molecules on neutrophils in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 98: 108-113

Osborn L (1990) Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* 62: 3-6

Palmblad J (1984) The role of granulocytes in inflammation. *Scand J Rheumatol* 13: 163-172

Parkos CA, Colgan SP, Liang TW, Nusrat A et al (1996) CD47 mediates post-adhesive events required for neutrophil migration across polarized intestinal epithelia. *J Cell Biol* 132: 437-450

Parkos CA, Delp C, Arnaout MA, Madara JL (1991) Neutrophil migration across a cultured intestinal epithelium. Dependence on a CD11b/CD18-mediated event and enhanced efficiency in physiological direction. *J Clin Invest* 88: 1605-1612

Patarroyo M, Prieto J, Rincon J, Timonen T et al (1990) Leukocyte-cell adhesion: a molecular process fundamental in leukocyte physiology. *Immunol Rev* 114: 67-108

Pellas TC, Boyar W, van Oostrum J, Wasvary J et al (1998) Novel C5a receptor antagonists regulate neutrophil functions in vitro and in vivo. *J Immunol* 160: 5616-5621

Philips MR, Buyon JP, Winchester R, Weissmann G et al (1988) Up-regulation of the iC3b receptor (CR3) is neither necessary nor sufficient to promote neutrophil aggregation. *J Clin Invest* 82: 495-501

Powles AV, Carmichael D, Hulme B, Thomas E et al (1990) Renal function after long-term low-dose cyclosporin for psoriasis. *Br J Dermatol* 122: 665-669

Rebuck N, Finn A (1994) Polymorphonuclear granulocyte expression of CD11a/CD18, CD11b/CD18 and L-selectin in normal individuals. *FEMS Immunol Med Microbiol* 8: 189-195

Richter J, Zetterberg E (1994) L-selectin mediates downregulation of neutrophil TNF receptors. *J Leukoc Biol* 56: 525-527

Rosales C, Brown EJ (1992) Signal transduction by neutrophil immunoglobulin G Fc receptors. Dissociation of intracytoplasmic calcium concentration rise from inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 267: 5265-5271

Ruocco V, Sacerdoti G (1991) Pemphigus and bullous pemphigoid due to drugs. *Int J Dermatol* 30: 307-312

Sams WM, Jr., Schur PH (1973) Studies of the antibodies in pemphigoid and pemphigus. *J Lab Clin Med* 82: 249-254

Sanchez-Madrid F, Krensky AM, Ware CF, Robbins E et al (1982) Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte-mediated cytotoxicity: LFA-1, LFA-2, and LFA-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 7489-7493

Sanchez-Mejorada G, Rosales C (1998) Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol* 63: 521-533

Scavuzzo M, Sagripanti A, Mosca F, Ambrogi F (2001) Modulation of beta2 integrin phenotype, adhesion, chemotaxis, and oxidative burst of neutrophils by cyclosporine. *Biomed Pharmacother* 55: 61-69

Schmidt E et al. (2000) New aspects in the pathogenesis of bullous pemphigoid. *Hautarzt* 51: 637-645

Schulze HJ, Mahrle G, Steigleder GK (1990) Topical cyclosporin A in psoriasis. *Br J Dermatol* 122: 113-114

Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA et al (1993) Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *J Clin Invest* 92: 1467-1476

Senior RM, Campbell EJ (1983) Neutral proteinases from human inflammatory cells. A critical review of their role in extracellular matrix degradation. *Clin Lab Med* 3: 645-666

Senior RM, Griffin GL, Fliszar CJ, Shapiro SD et al (1991) Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J Biol Chem* 266: 7870-7875

Shevach EM (1985) The effects of cyclosporin A on the immune system. *Annu Rev Immunol* 3: 397-423

Shimizu T, Honda Z, Nakamura M, Bito H et al (1992) Platelet-activating factor receptor and signal transduction. *Biochem Pharmacol* 44: 1001-1008

Simon DI, Rao NK, Xu H, Wei Y et al (1996) Mac-1 (CD11b/CD18) and the urokinase receptor (CD87) form a functional unit on monocytic cells. *Blood* 88: 3185-3194

Simon JC, Cruz PD, Jr., Tigelaar RE, Sontheimer RD et al (1991) Adhesion molecules CD11a, CD18, and ICAM-1 on human epidermal Langerhans cells serve a functional role in the activation of alloreactive T cells. *J Invest Dermatol* 96: 148-151

Simon SI, Burns AR, Taylor AD, Gopalan PK et al (1995) L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD11b/CD18) beta 2-integrin. *J Immunol* 155: 1502-1514

Simon SI, Chambers JD, Butcher E, Sklar LA (1992) Neutrophil aggregation is beta 2-integrin- and L-selectin-dependent in blood and isolated cells. *J Immunol* 149: 2765-2771

Sitaru C, Schmidt E, Petermann S, Munteanu LA, Brocker EB, Zillikens D (2002) Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *J Invest Dermatol* 118: 664-671.

Springer TA (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425-434

Springer TA, Dustin ML, Kishimoto TK, Marlin SD (1987) The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annu Rev Immunol* 5: 223-252

Stacker SA, Springer TA (1991) Leukocyte integrin P150,95 (CD11c/CD18) functions as an adhesion molecule binding to a counter-receptor on stimulated endothelium. *J Immunol* 146: 648-655

Stamper HP Jr, Woodruff JJ (1976) Lymphocyte homing into lymph nodes: in vitro demonstration of the selective affinity of recirculating lymphocytes for high-endothelial venules. *J Exp Med* 144: 828-833

Stanley JR, Hawley-Nelson P, Yuspa SH, Shevach EM et al (1981) Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell* 24: 897-903

Stoolman LM (1989) Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell* 56: 907-910

Takada Y, Puzon W (1993) Identification of a regulatory region of integrin beta 1 subunit using activating and inhibiting antibodies. *J Biol Chem* 268: 17597-17601

Takahashi N, Hayano T, Suzuki M (1989) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* 337: 473-475

Terui T, Zhen YX, Kato T, Tagami H (1995) Mechanism of human polymorphonuclear leukocyte adhesion to serum-treated corneocytes. *J Invest Dermatol* 104: 297-301

Thivolet J, Barthelemy H (1988) Bullous pemphigoid. *Semin Dermatol* 7: 91-103

Thivolet J, Barthelemy H, Rigot-Muller G, Bendelac A (1985) Effects of cyclosporin on bullous pemphigoid and pemphigus. *Lancet* Feb 9; 1 (8424): 334-335

Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM et al (1995) Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 374: 549-553

Valerius T, Stockmeyer B, van Spriel AB, Graziano RF et al (1997) Fc α RI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy. *Blood* 90: 4485-4492

Van den Berg RH, Siegert CE, Faber-Krol MC, Huizinga TW et al (1998) Anti-C1q receptor/calreticulin autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 111: 359-364

Vedder NB, Harlan JM (1988) Increased surface expression of CD11b/CD18 (Mac-1) is not required for stimulated neutrophil adherence to cultured endothelium. *J Clin Invest* 81: 676-682

Vejlsgaard GL, Ralfkiaer E, Avnstorp C, Czajkowski M et al (1989) Kinetics and characterization of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression on keratinocytes in various inflammatory skin lesions and malignant cutaneous lymphomas. *J Am Acad Dermatol* 20: 782-790

Voice JK, Lachmann PJ (1997) Neutrophil Fc gamma and complement receptors involved in binding soluble IgG immune complexes and in specific granule release induced by soluble IgG immune complexes. *Eur J Immunol* 27: 2514-2523

Von den Driesch P (1993) Epidermotropic neutrophilic granulocytes express MAC-1 (CD11b/CD18) rather than LFA-1 (CD11a/CD18). *Arch Dermatol Res* 285: 444-446

Ward PA (1971) Complement-derived leukotactic factors in pathological fluids. *J Exp Med* Sep 1; 134(3): Suppl: 109_s+

Ward PA, Hill JH (1972) Biologic role of complement products. Complement-derived leukotactic activity extractable from lesions of immunologic vasculitis. *J Immunol* 108: 1137-1145

Watkins PB (1990) The role of cytochromes P-450 in cyclosporine metabolism. *J Am Acad Dermatol* 23: 1301-1309

Weber-Matthiesen K, Sterry W (1990) Organization of the monocyte/macrophage system of normal human skin. *J Invest Dermatol* 95: 83-89

Weiss SJ (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320: 365-376

Wilson WA, Hughes GR, James O (1976) The complement system - a review. *West Indian Med J* 25: 3-9

Wollina U, Roth H (1987) Psoriasis vulgaris partim inversa and bullous pemphigoid. Case report and short review of the literature. *Dermatol Monatsschr* 173: 29-32

Wright SD, Jong MT (1986) Adhesion-promoting receptors on human macrophages recognize *Escherichia coli* by binding to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 164: 1876-1888

Yaar M, Gilchrist BA (1987) Bullous pemphigoid: disease of the aging immune system. *Clin Dermatol* 5: 135-145

Yednock TA, Rosen SD (1989) Lymphocyte homing. *Adv Immunol* 44: 313-378

Zhou L, Lee DH, Plescia J, Lau CY et al (1994) Differential ligand binding specificities of recombinant CD11b/CD18 integrin I-domain. *J Biol Chem* 269: 17075-17079

Zillikens D, Rose PA, Balding SD, Liu Z et al (1997) Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. *J Invest Dermatol* 109: 573-579

7. Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
BP	Bullöses Pemphigoid
CAM	cellular adhesion molecule
CD	cluster of differentiation
CR	Komplementrezeptor
CyA	Cyclosporin A
DAG	Diacylglycerol
ECM	extrazelluläre Matrix
ELAM-1	endothelial leucocyte adhesion molecule
gp	Glykoprotein
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMD	Inositolmonophosphatdehydrogenase
IP3	Inositoltriphosphat
kDa	Kilodalton
Mac-1	macrophage antigen-1
mAk	monoklonale Antikörper
MHC	major histocompatibility complex
MMF	Myophenolat Mofetil
N-Serum	Serum von gesunden Spendern
PAF	platelet-activating factor
PBS	phosphate buffered saline

TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TGF	tumor-growth-factor
VLA	very-late-antigen

8. Danksagung

Frau Prof. Dr. med. Moll danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und die Gelegenheit, meine Arbeit an der Klinik durchführen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. von den Driesch für die intensive und gute Betreuung während der gesamten Zeit.

Für die wertvolle Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der Experimente bedanke ich mich auch bei Birgit Mähniß, Justus Stadler, Daniel Vornhusen und Miriam Akdemir.

9. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Martina Spehlmann
Adresse	Gerstenbergstr. 9 22609 Hamburg Germany
Telefon	+49-(0)172-4362735
Geburtsdatum	4. Oktober 1974
Geburtsort	Hamburg, Germany
Familienstand	ledig

SCHULAUSBILDUNG

1981 - 1985	Grundschule Windmühlenweg, Hamburg
1985 – 1991	Gymnasium Hochrad, Hamburg
1991 – 1992	Walla Walla High School, Washington, USA
1992 – 1995	Gymnasium Hochrad, Hamburg
1995	Abitur

AUSBILDUNG

1997	Ausbildung zum Rettungssanitäter, DRK Rettungsdienstschule, Bellin
------	---

HOCHSCHULAUSBILDUNG

1995 – 1996	Studium Rechtswissenschaft, Universität Kontanz
1996 – 1998	Studium Rechtswissenschaft, Universität Kiel
1998 bis dato	Studium Humanmedizin, Universität Hamburg
2000	Physikum
2001	1. Staatsexamen
2003	2. Staatsexamen

10. Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....