Aus der Klinik und Poliklinik
für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Universität Würzburg
Direktorin: Prof. Dr. med Eva-Bettina Bröcker

Optimierung des Immunoblot-Nachweises von Autoantikörpern bei Blasen bildenden Autoimmundermatosen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Andrea Roth

aus Öhringen

Würzburg, Mai 2007

Referent: Prof. Dr. med Detlef Zillikens

Koreferentin: Prof. Dr. med Eva-Bettina Bröcker

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 2007

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

2. Ziel der Arbeit 16

3. Material und Methoden 17

3.1 Patientenseren 17

3.1.1 Negativkontrollen 19

3.2 Polyklonale und Monoklonale Antikörper 19

3.2.1 Polyklonale Antikörper 20

a) primäre polyklonale Antikörper

b) sekundäre polyklonale Antikörper

3.2.2 Monoklonale Antikörper 20

a) primäre monoklonale Antikörper

b) sekundäre monoklonale Antikörper

3.3 Komplement-Bindungstest 21

3.4 ELISA 21

3.4.1 BP 180 NC16A 21

3.4.2 Desmoglein 1 und Desmoglein 3 22

3.5 Konzentrierung der Proteine des Mediumüberstandes von HaCaT-Zellen 23

3.6 Präparation der epidermalen Extrakte 23

3.7 Präparation der extrazellulären Matrix von HaCaT-Zellen 24

3.8 Präparation der dermalen Extrakte 24

3.9 Präparation der Extrakte kultivierter Keratinozyten 25

3.10 Aufgereinigtes Laminin 5 25

3.11 Western Blot 26

4. Ergebnisse 29

4.1 Charakterisierung der Extrakte kultivierter Keratinozyten unter Verwendung von poly- und monoklonalen Antikörpern mit bekannter Spezifität 29

4.2 Nachweis von Autoantikörpern in Patientenseren mittels Immunoblot von Extraken kultivierter Keratinozyten 30

4.3 Optimierung des Nachweises von Autoantikörpern gegen Laminin 5 32

4.4 Charakterisierung der IgG_4-Reaktivität gegen Laminin 5 mit verschiedenen Extrakten 35

4.5 Charakterisierung der Autoantikörper in Seren von Patienten mit Schleimhautpemphigoid mittels extrazellulärer Matrix 36

4.6 Charakterisierung der IgG-Subklassen der Autoantikörper von Patienten mit Schleimhautpemphigoid mit extrazellulärer Matrix 36

4.7 Testung verschiedener Extrakte hinsichtlich des Nachweises der β_4-Untereinheit des $\alpha_6\beta_4$-Integrins mit einem monoklonalen Antikörper 38

4.8 Nachweis von Autoantikörpern gegen die β_4-Untereinheit des $\alpha_6\beta_4$-Integrins im Serum von Patienten mit Schleimhautpemphigoid mit extrazellulärer Matrix 38

4.9 Testung verschiedener Extrakte hinsichtlich des Nachweises von Typ VII Kollagen mit einem monoklonalen Antikörper 39

4.10 Vergleich der Reaktivität von Autoantikörpern von Patienten mit Epidermolysis bullosa acquisita gegen Kollagen Typ VII aus dermalem Extrakt und aus konzentriertem Überstand von kultivierten Keratinozyten 41

5. Diskussion 42

6. Zusammenfassung 48

7. Literatur 50

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

Die bullösen Autoimmundermatosen sind organspezifische Autoimmunkrankheiten, die durch das Auftreten einer Autoimmunantwort gegen Strukturproteine der Haut gekennzeichnet sind. Diese Proteine sind wichtig für den Zell-Zell-Kontakt der Keratinozyten bzw. für die Adhäsion der Epidermis auf der Dermis. Die Adhäsion zwischen Epithelzellen wird durch Verankerungskontakte, die über Aktin- oder Intermediärfilamente mit dem Zytoskelett der Zellen verbunden sind, vermittelt (Yancey, 1995). Verankerungskontakte, die zwei Epithelzellen verbinden, werden als **Desmosomen** bezeichnet, während **Hemidesmosomen** die Epithelzelle auf der Basalmembran verankern (Kowalczyk et al, 1999).

Desmosomen sind aus zwei Anteilen aufgebaut, den intrazellulär gelegenen Proteinen des desmosomalen Plaques und den transmembranösen Cadherinen, die mittels calciumabhängiger Interaktion ihrer extrazellulären Anteile die Verbindung benachbarter Keratinozyten vermitteln (**Abbildung 1**). Mit dem intrazellulären Anteil binden die Cadherine an Plakoglobin und Desmoplakin, Proteine des desmosomalen Plaques. Zu den in Keratinozyten exprimierten Cadherinen gehören die Desmogleine und Desmocolline (Kowalczyk et al, 1999). Je drei Subtypen von Desmogleinen (Dsg1, Dsg2, Dsg3) und Desmocollinen (Dsc1, Dsc2, Dsc3) wurden identifiziert (Buxton et al, 1993). Neben Cadherinen wurden auch verschiedene Plaqueproteine als Zielantigene von Autoimmundermatosen beschrieben (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Zielantigene von Autoimmundermatosen in Desmosomen. Desmosomen sind aus transmembranösen calciumabhängigen Cadherinen und den intrazellulär gelegenen Proteinen des desmosomalen Plaques aufgebaut.

Cadherine	**Desmosomale Plaques**
Desmoglein 1	Desmoplakin 1,2
Desmoglein 2	Periplakin
Desmoglein 3	Envoplakin
Desmocollin 1	Plektin
Desmocollin 2	Plakoglobin
Desmocollin 3	

Die **dermo-epidermale Junktionszone** (DEJ) besteht aus einem Netzwerk miteinander interagierender Strukturproteine, die das Zytoskelett des basalen Keratinozyten mit Verankerungsfibrillen der papillären Dermis verbinden (**Abbildung 1**). Elektronenmikroskopisch lassen sich innerhalb der DEJ die Lamina lucida, die direkt an den basalen Kerationzyten anschließt, die Lamina densa und die an die Dermis grenzende Sublamina densa voneinander abgrenzen (Borradori & Sonnenberg, 1999). Die zentrale Struktur der dermoepidermalen Interaktion bildet die hemidesmosomale Plaque, die am dermalen Pol des basalen Keratinozyten lokalisiert ist. Die Proteine der hemidesmosomalen Plaque stellen eine Verbindung der Zytokeratinfilamente mit den transmembranösen Ankerfilamenten her (Borradori & Sonnenberg, 1999; Burgeson & Christiano, 1997). Der intrazelluläre Anteil der transmembranösen Ankerfilamente BP180 und $\alpha_6\beta_4$-Integrin verbindet sich jeweils mit Proteinen der hemidesmosmalen Plaque (BP230, Plectin), während sich der extrazelluläre Anteil der Ankerfilamente in die Lamina lucida erstreckt (Borradori & Sonnenberg, 1999; Yancey, 1995). Über weitere filamentäre Proteine wie Laminin 5 und Laminin 6 wird ein Kontakt der transmembranösen Proteine zu Verankerungsfibrillen vermittelt, die von der Lamina densa der DEJ in die papilläre Dermis ragen, wo sie mit dermalen Kollagenfasern in Verbindung treten. Hauptbestandteil der **Verankerungsfibrillen** ist Kollagen Typ VII (Yancey, 1995).

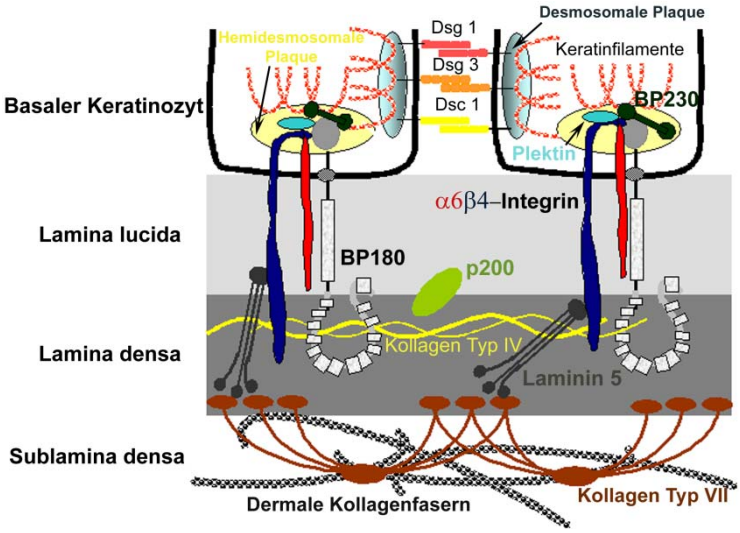

Abb. 1: Schematische Darstellung der desmosomalen Verbindung zwischen Keratinozyten sowie der dermoepidermalen Junktionszone. Desmosomen sind aus zwei Anteilen aufgebaut, den intrazellulär gelegenen Proteinen des desmosomalen Plaques und den transmembranösen Cadherinen (Desmogleine, Desmocolline), die mittels calciumabhängiger Interaktion ihrer extrazellulären Anteile die Verbindung benachbarter Keratinozyten vermitteln. Die zentrale Struktur der dermoepidermalen Interaktion bildet die hemidesmosomale Plaque, die am dermalen Pol des basalen Keratinozyten lokalisiert ist. Die Proteine der hemidesmosomalen Plaque stellen eine Verbindung der Zytokeratinfilamente mit den transmembranösen Ankerfilamenten (BP180, $\alpha_6\beta_4$-Integrin) her. Die extrazellulären Anteile von BP180 und $\alpha_6\beta_4$-Integrin finden über weitere filamentäre Proteine wie Laminin 5 und Laminin 6 Kontakt zu Verankerungsfibrillen (Kollagen Typ VII), die von der Lamina densa der Basalmembranzone in die papilläre Dermis ragen.

Die blasenbildenden Autoimmundermatosen werden jeweils nach den betroffenen Zielstrukturen in folgende Gruppen eingeteilt: die Pemphigus- und Pemphigoid-Erkrankungen, die Epidermolysis bullosa acquisita und die Dermatits herpetiformis Duhring (**Tabelle 2**). Bei den Pemphiguserkankungen liegt die Blasenbildung intra-, bei den übrigen bullösen Autoimmundermatosen subepidermal (Sitaru et al, 2004). Die Ätiologie der Autoimmunantwort ist bei bullösen Autoimmundermatosen unklar. Hinsichtlich der Pathogenese konnte die pathogene Wirksamkeit der Autoantikörper bei manchen bullösen Autoimmundermatosen in der Organkultur bzw. im Tiermodell nachgewiesen werden (Sitaru & Zillikens, 2005). Neben der Klinik und histopathologischen Untersuchung ist die direkte sowie indirekte Immunfluoreszenz die ausschlaggebende diagnostische Routinemethode. Die histopathologische Untersuchung spielt bei der Diagnostik bullöser Autoimmundermatosen nur eine

orientierende Rolle. In erster Linie dient sie dazu, die intraepidermale von subepidermaler Spaltbildung zu unterscheiden. Der Nachweis von Autoantikörpern in der Haut (positive direkte Immunfluoreszenz) sichert die Diagnose einer bullösen Autoimmundermatose, auch wenn sich hierfür keine spezifischen histologischen Veränderungen zeigen. Im Serum zirkulierende Autoantikörper werden durch indirekte Immunfluoreszenz auf Organschnitten nachgewiesen (**Abbildung 2 und 3**). Für Bestätigung und Sicherung der Diagnose einer spezifischen bullösen Dermatose ist der Nachweis molekulärer Spezifität der Autoantikörper durch immunserologische Tests hilfreich. Verschiedene Extrakte sowie rekombinante Formen der Zielantigene stehen neuerdings zur Verfügung und werden im Immunoblot oder ELISA eingesetzt.

Tabelle 2: Die blasenbildenden Autoimmundermatosen und die mit ihnen assoziierten Autoantigene der Haut. Die in dieser Arbeit untersuchten Autoimmundermatosen und deren Autoantigene sind fett unterlegt.

Blasenbildende Autoimmundermatose	**Autoantigen**
Pemphigus-Erkrankungen	**Autoantigene der Desmosomen**
Pemphigus vulgaris (PV)	**Desmoglein 3 > Desmoglein 1**
Pemphigus vegetans	Desmoglein 3
Pemphigus foliaceus (PF)	**Desmoglein 1**
Pemphigus herpetiformis	Desmoglein 1 > Desmoglein 3
Pemphigus erythematosus	Desmoglein 1, antinukleäre Antikörper
medikamenten-induzierter Pemphigus	Desmoglein 1, Desmoglein 3
Paraneoplastischer Pemphigus (PNP)	**Desmoplakin 1,2, Envoplakin,Periplakin, BP230, Plektin, Desmoglein1,3, 170 kDa Protein**
IgA Pemphigus	Desmoglein 1, Desmocollin 1
Pemphigoid-Erkrankungen	**Autoantigene der DEJ**
Bullöses Pemphigoid (BP)	**BP180, BP230**
Pemphigoid gestationis (PG)	**BP180, selten BP230**
Lineare IgA-Dermatose (LAD)	LAD1
Schleimhautpemphigoid (MMP)	**BP180, BP230, Laminin 5, Laminin 6, β_4- und α_6-Kette des $\alpha_6\beta_4$-Integrins**
Lichen planus pemphigoides	BP180, BP230,
Anti-p450-Pemphigoid	p450 (epidermales Protein)

Anti-p200-Pemphigoid Anti-p105-Pemphigoid	p200 (Protein der Lamina lucida) p105 (Protein der Lamina lucida)
Epidermolysis bullosa acquisita	**Kollagen Typ VII**
Dermatitis herpetiformis Duhring	Gewebstransglutaminase

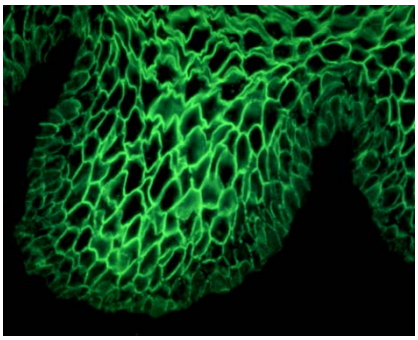

Abb. 2: Indirekte Immunfluoreszenz auf Affenösophagus bei intraepidermal Blasen bildenden Autoimmundermatosen. Interzelluläre Fluoreszenz des Epithels bei Patienten mit Pemphigus vulgaris, Pemphigus foliaceus, Pemphigus vegetans, Pemphigus herpetiformis, Pemphigus erythematosus, medikamenten-induziertem Pemphigus und paraneoplastischem Pemphigus

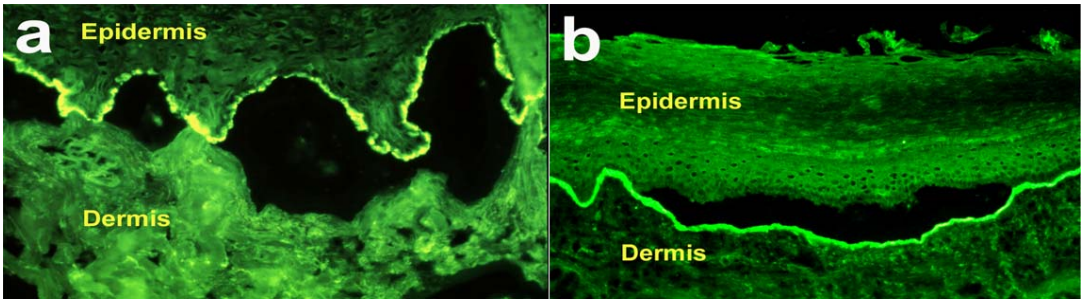

Abb. 3: Indirekte Immunfluoreszenz auf NaCl-separierter humaner Spalthaut bei subepidermal Blasen bildenden Autoimmundermatosen. a) Eine Bindung der zirkulierenden Autoantikörper an die epidermale Seite der artifiziell erzeugten Blase erfolgt bei bullösem Pemphigoid, Pemphigoid gestationis, Schleimhautpemphigoid, Lichen planus pemphigoides und linearer IgA-Dermatose (Autoantikörper gegen BP180, BP230 oder $\alpha_6\beta_4$-Integrin) b) Ein dermales Bindungsmuster tritt bei Epidermolysis bullosa acquisita, bei manchen Patienten mit Schleimhautpemphigoid (Autoantikörper gegen Laminin 5 oder Kollagen Typ VII) sowie beim Anti-p200 Pemphigoid auf.

Zu den Vertretern der Pemphigoid-Erkrankungen zählen das bullöse Pemphigoid (BP), das Pemphigoid gestationis (PG), die lineare IgA-Dermatose das Schleimhautpemphigoid (MMP, mucous membrane pemphigoid), der Lichen planus pemphigoides, das Anti-p450-, das Anti-p200 und das Anti-p105-Pemphigoid (Zillikens, 1999). Alle sind durch subepidermale Blasen, die elektromikroskopisch innerhalb der Lamina lucida der dermo-epidermalen Junktionszone (DEJ) lokalisiert sind, und durch Autoantikörper gegen

hemidesmosomale Strukturproteine gekennzeichnet. Die immunpathologische Charakteristik dieser Erkrankungen ist die lineare Ablagerung von Immunreaktantien an der DEJ in der direkten Immunfluoreszenz. Mittels indirekter Immunfluoreszenz lassen sich zirkulierende Autoantikörper nachweisen. Sensitivstes Substrat ist hierfür NaCl-separierte humane Spalthaut. Im Folgenden werden das bullöse Pemphigoid, das Pemphigoid gestationis und das Schleimhautpemphigoid näher dargestellt.

Das **bullöse Pemphigoid** (BP) ist die weitaus häufigste subepidermale blasenbildende Autoimmundermatose und betrifft überwiegend Patienten in höherem Lebensalter, wobei das männliche Geschlecht bevorzugt wird (Zillikens et al, 1995a; Bernard et al, 1995; Jung et al, 1999). Das Krankheitsbild ist durch pralle Blasen gekennzeichnet, die bevorzugt in den Intertrigines, am Abdomen und den Innenseiten der Oberschenkel auftreten (Zillikens et al, 1995b). Die Patienten klagen meist über ausgeprägten Juckreiz (Kippes et al, 1999). Das BP kann aber auch gänzlich ohne Blasenbildung unter dem Bild eines Ekzems, einer Urtikaria, oder einer Prurigo simplex subacuta verlaufen (Wever et al, 1995a). Die Autoantikörper der BP-Patienten sind gegen zwei hemidesmosomale Proteine gerichtet, BP180 und BP230 (Stanley et al, 1981; Labib et al, 1986). 40 % weisen auch Autoantikörper gegen das heterotrimere Ankerfilament Laminin 5 ($\alpha_3\beta_3\gamma_2$) auf (Bekou et al, 2005). Das BP180 ist ein transmembranöses Glykoprotein mit einer Typ II-Orientierung, d.h. der N-Terminus liegt intra- und der C-Terminus extrazellulär. Die Ektodomäne besteht aus 15 kollagenen und 16 nicht-kollagenen Domänen (Giudice et al, 1992; Zillikens & Guidice, 1999). Die sechzehnte nicht-kollagene Domäne (NC16A), die sich extrazellulär unmittelbar an der Zellmembran des basalen Keratinozyten befindet, stellt den immundominanten Abschnitt von BP180 dar (Zillikens et al, 1997). Die gegen BP180 NC16A gerichteten Autoantikörper gehören hauptsächlich der IgG4-Subklasse und IgE an (Döpp et al, 2000). BP230 liegt intrazellulär und ist ein Protein des hemidesmosomalen Plaques (Borradori & Sonnenberg, 1999). Es bindet mit dem C-Terminus an Keratinfilamente (Yancey, 1995), während der N-Terminus mit BP180 und $\alpha_6\beta_4$-

Integrin interagiert (Borradori & Sonnenberg, 1999). Die pathogenetische Bedeutung von Autoantikörpern konnte sowohl im Tiermodel (Liu et al, 1995; Hall et al, 1993) als auch in der Organkultur nachgewiesen werden. Jedoch können Autoantikörper nur dann eine subepidermale Spaltbildung auslösen, wenn gleichzeitig Komplement aktiviert und Entzündungszellen in die Haut rekrutiert werden (Gammon et al, 1982; Naito et al, 1982). Die subepidermale Spaltbildung ist in der Regel mit einem Infiltrat eosinophiler Granulozyten assoziiert. Der Serumspiegel der Autoantikörper gegen die immundominante NC16A-Domäne von BP180, nicht jedoch der Autoantikörpertiter der indirekten Immunfluoreszenz auf NaCl-separierter Spalthaut, korreliert mit der Krankheitsaktivität des bullösen Pemphigoid. Das lässt sich dadurch erklären, dass in der indirekten Immunfluoereszenz eine stärkere Reaktion mit BP230 als mit BP180 auftritt (Schmidt et al, 2000). Die Autoantikörper gegen BP230 bewirken wahrscheinlich eine Verstärkung der Entzündungsreaktion, nachdem bereits eine Schädigung des basalen Keratinozyten durch Autoantikörper gegen BP180 eingetreten ist (Hall et al, 1993). Nimmt man Biopsien von periläsionaler Haut und untersucht diese mit Hilfe der direkten Immunfluoreszenz, so findet man praktisch in allen Fällen lineare Ablagerungen von C3 und meist eine schwächere Ablagerung von IgG an der DEJ (Kippes et al, 1999; Zillikens, 2005). Mittels indirekter Immunfluoreszenz auf NaCl-separierter humaner Spalthaut lassen sich in etwa 90 % der BP-Patienten zirkulierende Autoantikörper nachweisen, die an der epidermalen Seite des artifiziell erzeugten Spalts binden (Kippes et al, 1999; Kelly & Wojnarowska, 1988). Weitere Nachweismethoden stehen in Form eines sensitiven BP180-ELISA mit rekombinantem NC16A-Protein (Fa. MBL, Japan) kommerziell zur Verfügung. Mittels Immunoblot mit Extrakten der Epidermis und kultivierter Keratinozyten könnten Autoantikörper gegen BP180 und BP230 in Serum von BP-Patienten nachgewiesen werden.

Das **Pemphigoid gestationis** (PG) ist eine schwangerschaftsassoziierte Erkrankung, die sich häufig auch ohne Blasenbildung mit juckenden ekzematösen, urtikariellen oder papullösen Hautveränderungen manifestiert

(Ogilvie et al, 2000; Wever et al, 1995b). In einzelnen Fällen wurde die Erkrankung auch im Zusammenhang mit Chorionkarzinom und Blasenmole bei weiblichen Patienten beobachtet (Shornick, 1987). Die Hautveränderungen beginnen oft periumbilical und breiten sich dann auf das Abdomen und die Oberschenkel aus. Die klinische Erstmanifestation des PG liegt im typischen Fall im zweiten Trimenon oder später. Bei gleicher Vaterschaft rezidiviert das PG in der Regel auch in allen späteren Schwangerschaften, wobei die Erkrankung dann früher beginnt und schwerer verläuft (Lawley et al, 1978, Shornick, 1987). Patientinnen mit PG weisen gehäuft die Haplotypen HLA-DR3 und -DR4 auf (Shornick 1987; Holmes et al, 1982). Die Autoantikörper sind vor allem gegen BP180 gerichtet, wobei als immundominate Region, genau wie beim BP, die NC16A-Domäne identifiziert wurde. Reaktivität mit Abschnitten von BP180 außerhalb der NC16A-Domäne oder mit BP230 finden sich dagegen selten (Morrison et al, 1988; Giudice et al, 1993). Im Gegensatz zum BP gehören die gegen BP180 NC16A gerichteten Antikörper des PG hauptsächlich der IgG1- und IgG3-Subklasse an (Chimanovitch et al, 1999). Die pathogenetische Bedeutung des mütterlichen IgG wird dadurch deutlich, dass es bei 5-10 % der Neugeborenen von Müttern mit einem PG durch diaplazentaren Übergang des IgG zu Urtikae und erythematösen Papeln, seltener auch zu Blasen kommt. Diese Veränderungen heilen innerhalb weniger Wochen ab. In der direkten Immunfluoreszenz lassen sich in allen Fällen lineare C3- und in ca. 30 % IgG-Ablagerungen an der DEJ nachweisen (Shornick, 1987). Mit der üblichen indirekten Immunfluoreszenz-Technik auf NaCl-separierter humaner Spalthaut lassen sich nur bei ca. 30 % der Patientinnen zirkulierende Autoantikörper nachweisen, die im Dach der artifiziellen Blase binden. Wird aber in einem Mehrschrittverfahren zusätzlich mit einer Komplementquelle inkubiert, kann bei über 90 % der Patientinnen ein komplementfixierender IgG-Autoantikörper, der sogenannte Herpes gestationis-Faktor nachgewiesen werden (Jordon et al, 1976). Die fast ausschließlich gegen die NC16A-Domäne von BP180 gerichtete Reaktivität der Autoantikörper im Serum der Patientinnen und der Neugeborenen lässt sich im Immunoblot und ELISA nachweisen.

Das **Schleimhautpemphigoid** (MMP) ist eine heterogene Erkrankung hinsichtlich des klinischen Bildes, der immunfluoreszenzoptischen Befunde und der Zielantigene. Die Blasenbildung tritt v.a. an den Schleimhäuten auf, seltener am übrigen Integument. Die Läsionen heilen außer in der Mundhöhle typischerweise unter Narbenbildung ab. Gefürchtete Komplikationen sind Erblindung bei Befall der Konjunktiven sowie Atemwegs- oder Ösophagusstrikturen (Mutasim et al, 1993).

Bei der Mehrzahl der Patienten stellt BP180 das Zielantigen dar. Die Immunantwort ist gegen verschiedene Abschnitte des BP180 gerichtet. Im Unterschied zum BP wird dabei zumeist das C-terminale Ende von BP180 erkannt. Manche MMP-Seren reagieren aber auch ausschließlich mit NC16A oder zentralen Abschnitten der BP180-Ektodomäne. Die Immunantwort gegen BP180 wird durch IgG- und/oder IgA-Autoantikörper vermittelt (Balding et al, 1996; Murakami et al, 1998). Der IgG- und IgA-Titer korreliert dabei mit der Krankheitsaktivität (Setterfield et al, 1999). Es gibt Hinweise darauf, dass das kombinierte Auftreten von Antikörpern der IgG- und IgA-Klasse mit einem schwereren Krankheitsverlauf einhergeht (Setterfield et al, 1998). Ca. 30 % der Patienten zeigen IgG-Autoantikörper gegen das heterotrimere Ankerfilament Laminin 5 ($\alpha_3\beta_3\gamma_2$) (Domloge-Hultsch et al, 1992). Laminin 5 verbindet transmembranöse Ankerproteine wie das BP180 und $\alpha_6\beta_4$-Integrin mit Molekülen der Lamina densa und Sublamina densa, unter anderem Typ VII Kollagen (Domloge-Hultsch et al, 1992; Chen et al, 1999). Die Immunantwort ist dabei meist gegen die α_3-Untereinheit gerichtet (Kirtschig et al, 1995). Der passive Transfer von Antikörpern gegen Laminin 5 in neonatale Mäuse führt zu einer subepidermalen Blasenbildung (Lazarova et al, 1996). Laminin 6 ($\alpha_3\beta_1\gamma_1$) ist ein weiteres heterotrimeres Protein der Lamina lucida/Lamina densa, gegen das die Immunantwort in Seren von Patienten mit Schleimhautpemphigoid gerichtet sein kann. Laminin 6 verfügt wie Laminin 5 über eine α3-Kette und wird daher genau wie Laminin 5 auch von den gegen diese Untereinheit gerichteten Autoantikörpern erkannt (Chan et al, 1997; Lazarova et al, 1998). Autoantikörper gegen die β_4-Untereinheit des $\alpha_6\beta_4$-Integrins wurden vor allem bei Patienten, bei denen eine vernarbende Augenbeteiligung im Vordergrund

steht, nachgewiesen (Tyagi et al, 1996; Chan et al, 1999). Bei einer Gruppe von Patienten, die ausschließlich Mundschleimhautveränderungen aufweisen, fanden sich Antikörper gegen die α_6-Kette des Integrins (Bhol et al, 2001).
Die direkte Immunfluoreszenz zeigt lineare Ablagerungen von IgG, C3 oder IgA an der DEJ. Mittels indirekter Immunfluoreszenz auf NaCl-separierter humaner Spalthaut lassen sich in etwa 50 % der Fälle IgG und/oder IgA-Autoantikörper nachweisen. Diese binden epidermal, wenn sie gegen BP180 oder $\alpha_6\beta_4$-Integrin, dermal, wenn sie gegen Laminin 5 gerichtet sind (Setterfield et al, 1998; Murakami et al, 1998; Leverkus et al, 2001). Die Autoantikörper können auch über Immunoblot nachgewiesen werden. Kürzlich wurde auch ein ELISA mit aufgereinigtem Laminin 5 zum Nachweis von Autoantikörper gegen Laminin 5 entwickelt (Bekou et al, 2005).

Zu den Vertretern der **Pemphigus-Erkrankungen** zählen der Pemphigus vulgaris (PV), der Pemphigus vegetans, der Pemphigus foliaceus (PF), der Pemphigus herpetiformis, der Pemphigus erythematosus, der medikamenten-induzierte Pemphigus, der IgA Pemphigus und als eigene Entität der Paraneoplastische Pemphigus (PNP). Alle diese Erkrankungen sind durch Auftreten von Autoantikörpern und autoreaktiven T-Zellen gegen desmosomale Strukturproteine gekennzeichnet. Zumeist sind Patienten im mittleren Lebensalter betroffen (Stanley & Amagai, 2006; Zillikens, 2005). Die histologische Untersuchung läsionaler Haut zeigt einen Verlust des Zell-Zell-Kontaktes mit intraepidermaler Spaltbildung. In der direkten Immunfluoreszenz von Biopsien periläsionaler Haut finden sich in der Epidermis interzelluläre Ablagerungen von Immunreaktantien (Beutner et al, 1968). Mittels indirekter Immunfluoreszenz lassen sich zirkulierende Autoantikörper nachweisen. Sensitivstes Substrat zum Nachweis von Serumantikörpern bei Pemphigus-Patienten ist Affenösophagus (Sabolinski et al, 1987). Die pathogenetische Bedeutung der Autoantikörper wurde 1982 im Tiermodell durch Anhalt et al. nachgewiesen. Einen weiteren Hinweis für die pathogenetische Bedeutung der Autoantikörper gaben auch die Korrelation der Titer der indirekten Immunluoreszenz mit der Krankheitsaktivität (Fitzpatrick & Newcomer, 1980),

sowie der neonatale Pemphigus. Beim neonatalen Pemphigus führt der transplazentare Übertritt von maternalen Pemphigusantikörpern zu einer temporären Erkrankung des Neugeborenen (Campo-Voegele et al, 2002; Hirsch et al, 2003).
Im Folgenden werden der Pemphigus vulgaris, der Pemphigus foliaceus und als eigene Entität der paraneoplastische Pemphigus dargestellt.

Beim **Pemphigus vulgaris** (PV) treten schlaffe Blasen und Erosionen vorwiegend an den Schleimhäuten auf, initial meist an der Mundschleimhaut. Wird zuerst das Integument betroffen, erfolgt im weiteren Verlauf der Erkrankung praktisch immer eine Beteiligung der Mundhöhle (Korman, 1988). Histologisch findet sich eine Akantholyse mit suprabasaler Spaltbildung, bei der die basalen Keratinozyten typischerweise auf der Basalmembran verbleiben (sog. Grabsteinmuster). In der direkten Immunfluoreszenz zeigen alle Patienten mit PV interzelluläre IgG-Ablagerungen in der Epidermis periläsionaler Haut (Beutner et al, 1968). Mittels indirekter Immunfluoreszenz können in über 90 % der Fälle zirkulierende IgG-Autoantikörper im Serum der Patienten nachgewiesen werden (Sabolinski et al, 1987; Beutner & Jordon, 1964). Die Autoantikörper sind in den meisten Fällen gegen Desmoglein 3 gerichtet, seltener auch gegen Desmoglein 1 (Eyre & Stanley, 1988; Hashimoto et al, 1990; Emery et al, 1995). Beide Autoantigene sind transmembranöse desmosomale Proteine (Mahoney et al, 1999). Zum Nachweis der Autoantikörper gegen Desmoglein 1 und 3 stehen auch ELISA-Systeme zur Verfügung (Ishii et al, 1997).

Patienten mit **Pemphigus foliaceus** (PF) entwickeln schlaffe Blasen, die sich leicht eröffnen und Erosionen und/oder blätterteigartige Schuppung hinterlassen. Betroffen sind vor allem Gesicht und Oberkörper unter Betonung der seborrhoischen Areale. Im Gegensatz zum PV bleiben die Schleimhäute immer frei (Stanley, 1993). Histologisch liegt die Spaltbildung des PF, im Gegensatz zum PV, im Stratum granulosum der Epidermis. Obwohl die Autoantikörper von PF-Patienten in der direkten Immunfluoreszenz eher in

oberen Schichten der Epidermis binden (Shimizu et al, 1995), ist eine sichere Abgrenzung zum PV mittels immunfluoreszenzoptischer Untersuchungen nicht möglich (Stanley, 1993). Die Autoantikörper erkennen ein 160 kDa schweres desmosomales Glykoprotein (Eyre & Stanley, 1988), das als Desmoglein 1 charakterisiert wurde (Koch et al, 1990). Eine Sonderform des PF tritt in bestimmten Regionen Südamerikas, vor allem im Zentrum Brasiliens und Kolumbien, sowie in Tunesien endemisch auf und wird deshalb als brasilianischer Pemphigus oder Fogo selvagem („wildes Feuer“) bezeichnet (Diaz et al, 1989; Bastuja-Garin et al, 1995). Er unterscheidet sich aber weder klinisch noch histologisch und immunpathologisch von der idiopathischen Form des PF (Kunte et al, 1997).

Die Frage, warum PV-Patienten fast immer Läsionen der Mundschleimhaut mit variabler Beteiligung des restlichen Integuments aufweisen, PF-Patienten dagegen praktisch ausschließlich unter Hautläsionen leiden, kann durch die unterschiedlich Expression des Desmoglein 1 (Dsg 1) und Desmoglein 3 (Dsg3) in Haut und Schleimhaut beantwortet werden. In verhornender Epidermis wird Dsg 3 zwar verstärkt in den unteren Schichten, Dsg 1 dagegen in allen Schichten der Epidermis exprimiert. Umgekehrt kommt in nichtverhornender Epidermis Dsg 3 in allen Schichten der Epidermis vor, während Dsg 1 vor allem im Stratum granulosum exprimiert wird (Mahoney et al, 1999). Die Bindung der Autoantikörper führt nur dort zur Blasenbildung, wo das entsprechend andere Desmoglein schwach exprimiert wird oder fehlt. Damit wird deutlich, dass PV-Patienten ausschließlich mit Veränderungen der Mundschleimhaut nur Autoantikörper gegen Dsg 3 aufweisen, dagegen Seren von PV-Patienten mit kombinierten Haut/Schleimhaut-Läsionen sowohl Dsg1 als auch Dsg3 beinhalten (Amagai et al, 1999; Ding et al, 1997). (**Abbildung 4**)

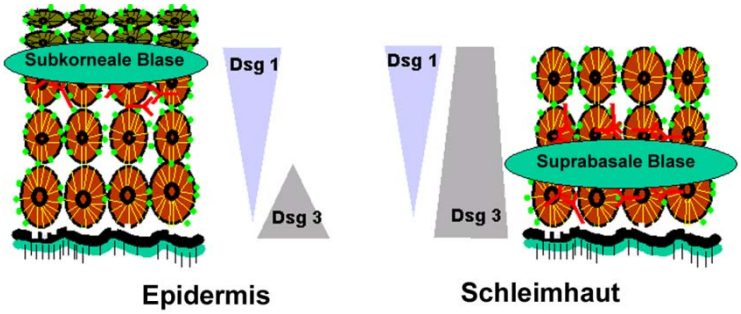

Abb. 4: Unterschiedliche Expression von Desmoglein 1 und Desmoglein 3 in verhornendem und nicht verhornendem Epithel. In verhornender Epidermis wird Desmoglein 1 in allen Schichten der Epidermis, verstärkt in den Oberen, Desmoglein 3 dagegen nur in den unteren Schichten exprimiert, deshalb erfolgt eine subkorneale Blase mit Spaltbildung im Stratum granulosum der Epidermis. Umgekehrt wird in Schleimhaut mit geschichtetem Plattenepithel Desmoglein 3 in allen Schichten, vor allem in den unteren Schichten, und Desmoglein 1 vor allem im Stratum granulosum exprimiert, es resultiert eine suprabasale Blase

Der **Paraneoplastische Pemphigus** (PNP) wurde 1990 von Anhalt et al an Hand von fünf Kriterien als eigene Entität vom Pemphigus vulgaris abgegrenzt: (1) schwere Mundschleimhauterosionen mit polymorphen Hautveränderungen mit oder ohne Blasen, (2) intraepidermale Akantholyse begleitet von Keratinozytennekrosen und vakuoliger Degeneration der Basalmembranschicht, (3) Ablagerungen von IgG und C3 sowohl interzellulär als auch an der Basalmembran in der direkten Immunfluoreszenz, (4) zirkulierende Serumantikörper, die nicht nur auf Affenösophagus sondern auch auf Harnblasenepithel binden, und die (5) einen charakteristischen Proteinkomplex in Keratinozytenextrakten immunpräzipitieren (Anhalt et al, 1990). Dieser Komplex umfasst mittlerweile neun Proteine: Desmoplakin 1 (250 kDa), BP230 (230 kDA), Desmoplakin 2 (210 kDa), Envoplakin (210 kDa), Periplakin (190 kDa), Plektin (500 kDa), ein noch nicht näheres charakterisiertes 170 kDa Protein, Desmoglein 1 (160 kDa) und Desmoglein 3 (130 kDa) (Anhalt et al, 1990; Kim et al, 1997; Mahoney et al, 1998). Nicht jedes Serum präzipitiert jedoch alle Proteine dieses Komplexes (Anhalt et al, 1990). Im Tiermodel wurde gezeigt, dass für die Blasenbildung Autoantikörper gegen Desmoglein 3 verantwortlich sind (Amagai et al, 1998). Die pathogenetische Bedeutung der anderen Autoantikörper bei dieser Erkrankung ist noch unklar. Zusätzlich liegt bei dieser Erkrankung eine okkulte oder manifeste Neoplasie vor. Die bullöse

Dermatose kann der assoziierten Neoplasie vorausgehen, häufiger treten die Hautveränderungen zeitgleich oder nach der Diagnose des Tumors auf (Anhalt et al, 1990; Zillikens & Bröcker, 1994). Im Urothel werden, im Gegensatz zum Plattenepithel, neben Desmoglein 1 und Desmoglein 3 auch Desmoplakine exprimiert. Die Bindung der Autoantikörper an diese Desmoplakine erklärt die Reaktivität der PNP-Seren mit Harnblasenepithel in der indirekten Immunfluoreszenz. Seren von Patienten mit PNP erkennen Periplakin und Envoplakin mittels Immunblot auf Extrakten der Epidermis oder kultivierten Keratinozyten.

Die **Epidermis bullosa acquisita** (EBA) ist durch Autoantikörper gegen das 290 kDa schwere Kollagen Typ VII charakterisiert, das den Hauptanteil der Ankerfibrillen der Lamina densa/subdensa bildet (Woodley et al, 1984). Kollagen Typ VII besteht aus drei identischen α-Ketten, deren zentrale Kollagendomäne jeweils von einer größeren N-terminalen nichtkollagenen Domäne (NC1) sowie der kleineren C-terminalen NC2-Domäne flankiert wird (Woodley et al, 1988). Zwei Moleküle verbinden sich über die NC2-Domäne. Die NC1-Domäne, die in der Lamina densa lokalisiert ist, bildet den immundominanten Abschnitt des Kollagen Typ VII (Lapiere et al, 1993). Klinisch unterscheidet man drei Varianten der EBA. Die häufigste Variante ist die mechanobullöse Form. Hier finden sich pralle Blasen an mechanisch beanspruchten Körperstellen, insbesondere an den Streckseiten der Gelenke. Die Läsionen können unter Narben- und Milienbildung abheilen und zu Nageldystrophie oder Alopexie führen (Roenigk et al, 1971). Bei der generalisiert entzündlichen Variante ähnelt das klinische Bild dem Bullösen Pemphigoid (Zillikens et al, 1994). Eine dritte Form befällt vorwiegend die Schleimhäute und ist klinisch nicht von den übrigen Varianten des vernarbenden Schleimhautpemphigoids abzugrenzen (Luke et al, 1999). Die Pathogenität der Autoantikörper wurde in der Organkultur gezeigt. Histopathologisch sieht man eine subepidermale Blase. Bei der mechanobullösen Variante findet sich, im Gegensatz zur entzündlichen Form, ein nur geringes Entzündungsinfiltrat aus Neutrophilen und Eosinophilen. In der

direkten Immunfluoreszenz lassen sich direkte Ablagerungen von IgG und C3 an der DEJ nachweisen (Smoller & Woodley, 1992). In seltenen Fällen finden sich nur IgA-Ablagerungen (Zambruno et al, 1994). In der indirekten Immunfluoreszenz lassen sich in ca. 50 % der Patienten zirkulierende IgG-oder IgA-Autoantikörper im Boden der artifiziellen Blase nachweisen (Gammon et al, 1984). Im Immunoblot läßt sich die Reaktivität mit Typ VII Kollagen durch Verwendung dermaler Extrakte oder einer rekombinanten Form des immundominanten Abschnitts von Kollagen Typ VII, der NC1-Domäne, nachweisen (Woodley et al, 1984). Mit diesem rekombinanten Protein wurde auch ein sensitiver ELISA entwickelt (Chen et al, 1997).

2. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns mit der Optimierung des Immunoblot-Nachweises von Autoantikörpern bei Blasen bildenden Autoimmundermatosen befasst. Unser Hauptziel war es, ein geeignetes Extrakt zu finden, mit dem ein Nachweis von möglichst vielen Zielantigenen möglich ist. Dies ist deshalb so wichtig, da bisher nicht für alle Epitope rekombinante Proteine zur Verfügung stehen. Ein Nachteil der in Bakterien exprimierten rekombinanten Proteine ist außerdem, dass sie bezüglich der posttranslationellen Modifikationen nicht humanen Proteinen entsprechen. In diesem Zusammenhang analysierten wir die Reaktivität von 78 BP-, 18 PG-, 11 MMP-, 5 PNP-, 6 PV- und 2 PF-Seren mit kultivierten Keratinozytenextrakten. Anschließend optimierten wir im Besonderen den Nachweis von Laminin 5, $\alpha_6\beta_4$-Integrin und Kollagen Typ VII.

3. Material und Methoden

3.1 Patientenseren

Wir untersuchten die Seren von 133 Patienten. Davon waren 78 Patienten mit bullösem Pemphigoid, 18 Patienten mit Pemphigoid gestationis, 22 Patienten mit Schleimhautpemphigoid, 5 Patienten mit paraneoplastischem Pemphigus, 6 Patienten mit Pemphigus vulgaris, 2 Patienten mit Pemphigus foliaceus und 2 Patienten mit Epidermolysis bullosa acquisita. Als Kontrollgruppe verwendeten wir Seren von 20 Patienten, die keine spezifischen klinischen Zeichen und immunfluoreszenzoptischen Befunde einer Autoimmundermatose aufwiesen.
Alle Blutproben wurden vor Therapiebeginn entnommen, bei 3000 U/min 10 min lang zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand portioniert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Die direkte Immunfluoreszenz (DIF) periläsionaler Haut wurde wie beschrieben durchgeführt (Zillikens et al, 1996). Weiterhin wurde die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) wie beschrieben mit 1 M NaCl-Spalthaut als Substrat angewendet (Zillikens et al, 1996). Eine Ausnahme bildeten die Patienten mit Pemphigoid gestationis, bei denen statt einer indirekten Immunfluoreszenz ein Komplement-Bindungstest durchgeführt wurde. Die Beschreibung dieser Methode folgt weiter unten. Alle Patienten wiesen typische Manifestationen ihrer Erkrankung auf **(Tabelle 3)**.

Von den 78 Patienten mit bullösem Pemphigoid (BP) waren 45 weiblich und 33 männlich. Ihr Alter lag zwischen 44 und 97 Jahren mit einem Durchschnitt von 77,3 Jahren. Soweit eine Hautbiopsie vorhanden war, wurde die DIF durchgeführt, bei der sich immer homogen lineare Ablagerungen von C3 und etwas seltener auch von IgG an der Basalmembran fanden. Alle 78 Patienten hatten bei der IIF Bindung von IgG im Blasendach. Zusätzlich wiesen 35 Patienten IgA-Bindung auf. Die Anwesenheit von Autoantikörpern gegen BP180 NC16A wurde bei 73 BP-Patienten entweder durch BP 180 NC16A ELISA oder durch Immunoblot mit rekombinantem NC16A bestätigt.

Das Alter der 18 weiblichen Patientinnen mit Pemphigoid gestationis (PG) lag zwischen 17 und 38 mit einem Durchschnitt von 28,7 Jahren. Im Komplement-

Bindungstest fand man bei allen Patientinnen Bindung der komplementfixierten Autoantikörper im Blasendach. Des Weiteren konnte die Anwesenheit von Autoantikörpern gegen BP180 NC16A durch ELISA und durch Immunoblot mit rekombinantem NC16A verifiziert werden.

Von den 22 Patienten mit Schleimhautpemphigoid waren 13 weiblich und 9 männlich. Ihr Alter lag zwischen 57 und 97 Jahren mit einem Durchschnitt von 69,2 Jahren. In der DIF zeigten 10 Patienten homogen lineare Ablagerung von IgG und C3 an der Basalmembran, vier davon zusätzliche Ablagerung von IgM und einer davon vorwiegend IgA-Ablagerungen. Bei der IIF fand man bei sieben Patienten IgG-Bindung im Blasenboden, bei sechs Patienten banden die Autoantikörper im Blasendach. Die restlichen neun Patienten zeigten in der IIF keine Reaktivität.

Die 5 Patienten mit Paraneoplastischem Pemphigus (PNP) waren alle männlich. Ihr Alter lag zwischen 23 und 87 mit einem Durchschnitt von 67 Jahren. Drei Patienten zeigten bei der IIF ein interzelluläres Bindungsmuster. Die DIF wurde bei keinem der Patienten durchgeführt. Die Anwesenheit von Autoantikörpern gegen Desmoglein 1 und Desmoglein 3 konnte mittels ELISA bei 3 Patienten nachgewiesen werden.

Von den 8 Patienten mit Pemphigus hatten sechs Patienten einen PV und zwei Patienten einen PF. Beide PF-Patienten waren männlich. Bei den PV Patienten waren fünf weiblich und einer männlich. Das Alter lag zwischen 14 und 77 mit einem Durchschnitt von 58,1 Jahren. Die DIF wurde bei vier Patienten durchgeführt und zeigte interzelluläre Ablagerungen von IgG und C3. Alle Patienten zeigten bei der IIF interzelluläre Bindung von IgG. Die Anwesenheit von Autoantikörpern gegen Desmoglein 1 und gegen Desmoglein 3 konnte mittels ELISA bestätigt werden.

Die 2 Patienten mit Epidermolysis bullosa acquisita waren weiblich. Das Alter lag im Durchschnitt bei 74 Jahren. In der DIF zeigten beide homogen lineare IgG-Ablagerungen an der Basalmembran. In der IIF fand man bei beiden Patientinnen IgG-Bindung am Blasenboden.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Immunfluoreszenz-, ELISA-, und Immunoblotergebnisse der untersuchten Patienten mit Blasen bildenden Autoimmundermatosen.

Patienten	DIF	IIF/KBT			IB	ELISA
		epidermal	dermal	interzellulär		
BP, n=78	49	78/78	-	-	51/61	43/53
PG, n=18	2	18/18	-	-	16/18	17/18
MMP, n=22	10	6/22	7/22	-	-	-
PF, n=2	1	-	-	2/2	2/2 (Dsg1)	2/2 (Dsg1) 1/2 (Dsg3)
PV, n=6	3	-	-	6/6	5/6 (Dsg3) 2/6 (Dsg1)	5/5 (Dsg3) 3/5 (Dsg1)
PNP, n=5	-	-	-	3/5	-	2/4 (Dsg1) 3/4 (Dsg3)
EBA, n=2	2	-	2/2	-	-	-

3.1.1 Negativkontrollen

Als Negativkontrollen dienten uns Seren von 20 Patienten, die nicht an einer Autoimmundermatose erkrankt waren, sondern an Erkrankungen anderer Genese. Von den 20 Patienten waren 15 weiblich und 5 männlich. Das Alter lag zwischen 16 und 73 Jahren, mit einem Durchschnitt von 46 Jahren. Die Blutproben wurden bei 3000 U/min zentrifugiert, der Überstand portioniert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.2 Polyklonale und monoklonale Antikörper

Die vorcharakterisierten polyklonalen und monoklonalen Antikörper stammten entweder von verschiedenen Anbietern oder wurden uns freundlicherweise von anderen Forschungslabors zur Verfügung gestellt. Besonders danken möchten wir Professor David R. Garrod, Manchester, für die Bereitstellung des polyklonalen Antikörpers gegen Desmocollin 1 und Dr. Kim B. Yancey, Milwaukee, für die Bereitstellung des polyklonalen Antikörpers gegen Laminin 5.

3.2.1 Polyklonale Antikörper

a) primäre polyklonale Antikörper

Bezeichnung	TYP	Verdünnung	Beschreibung
136	Rabbit-anti C-Terminus von BP180	1:1000	Balding et al, 1996
-	Rabbit-anti C-Terminus von BP230	1:100	Tanaka et al, 1990
-	Rabbit-anti Laminin5	1:5000	Lazarova et al, 1996
JCMC	Rabbit-anti Desmocollin 1	1:200	North et al, 1996
SA 8009	Rabbit-anti NC16A von BP180	1:500	Sitaru et al, 2002
-	Rabbit-anti Desmoplakin	1:200	Serotec, Oxford, UK

b) sekundäre polyklonale Antikörper

Bezeichnung	TYP	Verdünnung	Herkunft
-	Rabbit-anti Human IgG HRP	1:500	DAKO, Glostrup, DK
-	Rabbit-anti Human IgA HRP	1:500	DAKO, Glostrup, DK
-	Rabbit-anti Mouse HRP	1:500	DAKO, Glostrup, DK
-	Goat-anti Rabbit HRP	1:500	DAKO, Glostrup, DK

3.2.2 Monoklonale Antikörper

a) primäre monoklonale Antikörper

Bezeichnung	TYP	Verdünnung	Herkunft
LH 7.2	Mouse-anti NC1-Domäne von Kollagen Typ VII	1:100	Sigma, St. Louis, USA
-	Mouse-anti β4-Integrin	1:500	Serotec, Oxford, UK

b) sekundäre monoklonale Antikörper

Bezeichnung	TYP	Verdünnung	Herkunft
-	Mouse-anti Human IgG	1:4000	Sigma, St. Louis, USA
-	Mouse-anti Human IgG1 HRP	1:500	The Binding Site, Birmingham, UK
-	Mouse-anti Human IgG2 HRP	1:200	The Binding Site, Birmingham, UK
-	Mouse-anti Human IgG3 HRP	1:250	The Binding Site, Birmingham, UK
-	Mouse-anti Human IgG4 HRP	1:250	The Binding Site, Birmingham, UK

3.3 Komplement-Bindungstest

Der Komplement-Bindungs-Test wurde wie beschrieben (Katz et al, 1976, Sitaru et al, 2004) für alle 18 Patienten-Seren mit Pemphigoid gestationis auf Gefrierschnitten menschlicher Haut durchgeführt. Hierbei wurden die Gefrierschnitte 1 h lang mit Patientenserum, das wir 1:10 in NeutrAB (Dade Behring AG, Düdingen, Schweiz) verdünnten, inkubiert und danach in PBS gewaschen. Komplementreiches Serum wurde 5-fach in PBS verdünnt und die Schnitte 30 min damit inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die mit komplementreichem Serum inkubierten Schnitte 30 min lang mit 1:100 in PBS verdünntem FITC-markiertem Ziege-Antikörper gegen humanes C3 (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) als drittem Antikörper inkubiert, um das gebundene Komplement sichtbar zu machen. Danach wurden die Schnitte in PBS gewaschen, mit 20 %igem-Glycerin-Eindeckmedium eingedeckt und mit einem Leitz Laborlux S-Immunfluoreszenzmikroskop (Leica Microstems AG, Wetzlar, Deutschland) beurteilt.

3.4 ELISA

3.4.1 BP180 NC16A

Als Screeningmethode zum Nachweis von Antikörpern gegen BP180 NC16A in BP- und PG-Seren benutzten wir BP180 NC16A ELISA (enzymed-linked immunosorbent assay), ein ELISA-System, das rekombinantes affinitätsaufgereinigtes Fusionsprotein GST-NC16A1-5 als Zielantigen verwendet (Zillikens et al, 1997b). Der Elisa wurde an Mikrotiterplatten der Firma Corning Inc. (Corning, USA) bei RT durchgeführt. Zuerst wurde die Mikrotiterplatte mit Hilfe des Mikrotiterplattenwaschgerätes (Sanofi Diagnostics Pasteur, Strasbourg, Frankreich) mit Phosphat Buffered Saline (PBS)-Puffer zweimal gewaschen. Die rekombinanten affinitätsaufgereinigten GST-NC16A1-5 und GST wurden mit Carbonat/Bicarbonat-Puffer (0,04 M Na_2CO_3, 0,06 M $NaHCO_3$ [beide Merck, Darmstadt], pH 9,6) so verdünnt, dass sich bei anschließender Beschichtung der Platte die Konzentration von 300 ng GST-NC16A1-5 bzw. 76 ng GST pro Vertiefung ergab. Für jeden Patienten wurden

jeweils drei Vertiefungen mit GST-NC16A1-5 und GST beschichtet. Die beschichtete Mikrotiter-Platte wurde für 2 h inkubiert und anschließend fünfmal mit PBS gewaschen. Dann wurde der Blocking-Puffer (1 % BSA in PBS, PH 7,4) aufgetragen und nach 1 h Inkubation der Waschvorgang wiederholt. Die Patienten- und Kontrollseren wurden daraufhin 1:100 mit Verdünnungspuffer (1 % BSA, 0,05 % Tween-20 in PBS, pH 7,4) verdünnt und je 50 µl/Vertiefung auf die Platte gegeben. Nach 1 h Inkubationszeit wurden die Vertiefungen gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (peroxidase-gekoppelte Kaninchen-anti-humane polyklonale IgG, DAKO, Glostrup, Dänemark) beschichtet. Der Sekundärantikörper wurde 1:12000 im gleichen Puffer wie die Primärseren verdünnt. Nach einer Stunde Inkubation und dem letzten Waschvorgang wurde eine Tablette o-Phenylendiamin (Sigma, St. Louis, USA) in 10 ml Aqua dest. aufgelöst und die resultierende Lösung nach Zugabe von 10 µl 30 % H_2O_2 (Merck, Darmstadt) auf die Platte gegeben. Nach 10 min wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 2 N H_2SO_4 (Merck, Darmstadt) abgestoppt und die Extinktion bei OD492 mittels eines elektronischen Spektralphotometers (SLT SPECTRA Laborinstrumente, Österreich) gemessen. Der Durchschnitt der drei GST-Werte wurde vom Durchschnitt der drei GST-NC16A1-5-Werte bei jedem Patienten subtrahiert. Als Grenze zwischen positivem und negativem Resultat wurde OD492 = 0,200 festgelegt. Dieser Wert ergab sich aus Mittelwert von 50 Negativkontrollen plus zwei Standardabweichungen (SD).

3.4.2 Desmoglein 1 und 3

Zum Nachweis von Desmoglein 1 und 3 Antikörpern in PV- und PF-Seren wurde der ELISA-Kit der Firma Medical & Biological Laboratories CO., LTD. (Naka-ku Nagoya, Japan) benutzt. Die Mikrotiterplatten waren gebrauchsfertig mit rekombinantem Desmoglein 1 und 3 beschichtet. Der ELISA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Ishii et al, 1997).

3.5 Konzentrierung der Proteine des Mediumüberstandes von HaCaT-Zellen

HaCaT-Zellen sind eine immortalisierte humane Keratinozyten-Zellinie. Sie wurden in Keratinozytenwachstums-Medium (KGM) ohne Serum mit niedrigem Calciumgehalt, das mit Hypophysenextrakt aus Rindern und epidermalem Wachstumsfaktor (alle Cell Systems, St. Katharinen, Deutschland) ergänzt wurde, kultiviert (Schäcke et al, 1998; Hirako et al, 1998). Bei 70 % Konfluenz der Zellen wurde L-Ascorbinsäure (Sigma, St. Louis, USA) in einer Konzentration von 100 μg/ml Medium zugegeben. Nach 48 h weiterer Kultivierung wurde der Mediumüberstand abgezogen und unmittelbar auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 5 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Sigma, St. Louis, USA) und 1 nM PMSF wurde das Medium 7 min lang bei 2000 U/min und 4 °C zentrifugiert, um den Zelldebris zu entfernen. Der Überstand wurde mit 30 % Ammoniumsulfat (Merck, Darmstadt) versetzt und 2 h auf Eis gelegt. Die so gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (16000 x g, 90 min, 4 °C) vom übrigen Medium getrennt. Der Überstand wurde anschließend verworfen, der Bodensatz wurde mit 300 μl eines Puffers bei 4 °C resuspendiert, der sich wie folgt zusammensetzte: 25 mM Tris (pH 7,8) (Roth, Karlsruhe), 65 mM NaCl, 5 mM EDTA und 1 mM Aminoethyl-Benzensulfonyl-Fluorid (AEBSF) (Sigma, St. Louis, USA). Die Suspension wurde 2 h lang auf Eis belassen. Anschließend wurde bei 4 °C gegen Resuspensionpuffer dialysiert (Spectra/Por 2 Dialysis Membrane, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA), um das Ammoniumulfat aus der Suspension zu entfernen. Nach 16 h Dialyse wurde die dialysierte Probe bei 13000 x g und 4 °C 20 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 5 mM EDTA und 1 mM AEBSF versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

3.6 Präparation der epidermalen Extrakte

Neonatale Vorhaut wurde bei 4 °C mit der epidermalen Seite nach unten in PBS-Puffer, der 1 M NaCl, 2 mM EDTA und 1 mM AEBSF enthielt, gelegt, um

Epidermis und Dermis voneinander zu trennen. Nach 48 h wurde die Epidermis mit einer Pinzette von der Dermis abgelöst, dreimal mit PBS bei 4 °C gewaschen und in 400 µl eines Puffers gegeben, der sich wie folgt zusammensetzte: 62,5 mM Tris-Hydrochlorid (pH 6,8) (Roth, Karlsruhe), 100 mM Dithiothreitol (Sigma, St. Louis, USA), 2 mM EDTA, 1 mM AEBSF, 2 % SDS (Merck, Darmstadt). Nach 2 min Vortexen wurde die Suspension anschließend sonikiert. Danach wurden die Extrakte 30 min lang bei 14000 x g und 4 °C zentrifugiert, um den Gewebedebris aus der Suspension zu entfernen. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.7 Präparation der extrazellulären Matrix von HaCaT-Zellen

Die HaCaT-Zellen wurden wie oben beschrieben kultiviert (Schäcke et al, 1998). Nachdem die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurden sie mit PBS gewaschen. Um sie von ihrer Matrix zu lösen, wurden sie mit 20 mmol/l NH_4OH (Aldrich, Steinheim, Deutschland) versetzt. Das NH_4OH wurde solange auf den Zellen belassen, bis unter dem Mikroskop die Trennung von der Matrix sichtbar war (ca. 5 min). Anschließend wurden die Zellen entfernt und die verbleibende Matrix dreimal kurz mit PBS gewaschen. Um die Matrix aufzulösen, wurde sie mit Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) versetzt und mit einem Gummizellschaber von der Gewebekulturflasche (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) abgeschabt. Zum Schluss wurde die gelöste Matrix bei 95 °C 2 min lang gekocht, zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

3.8 Präparation der dermalen Extrakte

Aus der Dermis neonataler Vorhaut wurde ein Extrakt gewonnen, das natives Kollagen Typ VII enthält, das Antigen der Epidermolysis bullosa acquisita (Shimanovich et al, 2003; Sitaru et al, 2004). Dazu wurde von der Vorhaut zuerst das subkutane Fettgewebe entfernt. Dann wurde sie 45 sec in einem Wasserbad bei 57 °C erhitzt, damit anschließend die Epidermis von den

darunter liegenden dermalen Proteinen mit Hilfe von feinen Pinzetten entfernt werden konnte. Die Dermis wurde für 1 h bei Raumtemperatur in einem Extraktionspuffer mit folgender Zusammensetzung inkubiert: 8 M Harnstoff (Pharmacia, Schweden), 2 % SDS (Merk, Deutschland), 12,5 mM Tris-HCl (Roth, Deutschland), 0,1 M DTT, 1 mM PMSF, 2 mM EDTA (beide Sigma) in dH2O. Die Vorhaut wurde herausgenommen, das Extrakt mit einer SDS-Lösung versetzt, 2 min gekocht und 2 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Die Probe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

3.9 Präparation der Extrakte kultivierter Keratinozyten

Normale humane Keratinozyten wurden aus neonataler humaner Vorhaut isoliert und in Gewebekulturflaschen (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) in Keratinozytenwachstums-Medium (KGM) (Clonetics, La Jolla, CA) mit 0,15 mM Ca^{2+}, bei 37 °C in feuchter Atmosphäre, die 5 % CO_2 enthielt, angezüchtet. Der zusammenfließende Film der dritten Passage der Keratinozyten wurde extrahiert. Dazu verwendeten wir eine Lösung, die sich aus 2 % SDS, 5 % beta-Mercaptoethanol und 2 mmol/l Phenilmethylsulfonylfluoride in 0.5 mol/l Tris-HCl (pH 6.8) (alle von Sigma Chemical, St. Louis. MO) zusammensetzte. Anschließend wurden die aufgelösten Keratinozyten mit einem Gummizellschaber vom Boden der Gewebekulturflasche abgeschabt, bei 20000 x g zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen, aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

3.10 Aufgereinigtes Laminin 5

Das aufgereinigte Laminin 5 bezogen wir von Chemicon International, Inc., Temecula, CA. Das Laminin 5 wurde aus humanen Magencarcinom Zellen, den sogenannten STCM-1 Zellen, gewonnen und daraus aufgereinigt.

3.11 Westernblot

Wenn nicht anders im Text gekennzeichnet, stammten alle für die Analyse erforderlichen Geräte und Reagenzien von BioRad Laboratories (Hercules, USA). Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page) erfolgte an Glycerolgelen, die jeweils verschieden zusammengesetzt wurden.
Für Extrakte kultivierter Keratinozyten, konzentrierten Überstand von HaCaT-Zellen, extrazelluläre Matrix und epidermale Extrakte verwendeten wir 7,5 % Trenngele und 4 % Sammelgele, die sich wie folgt zusammensetzten.
Trenngel 7,5 %: 7,5 % Acrylamid-bis (49:1) (AppliChem, Darmstadt), 0,2 M Tris-(hydromethyl)-aminomethan (Roth, Karlsruhe), 5 % Glycerol (Fluka, Buchs, Schweiz), 0,1 M Glycin (Roth, Karlsruhe), 0,4 % SDS (Merck, Darmstadt), 0,12 % Tetramethylethylendiamin (Sigma, St. Louis, USA), 0,15 % Ammoniumpersulfat (Sigma, St. Louis, USA), pH 8,8.

Sammelgel 4 %: 4 % Acrylamid-bis (49:1), 70 mM Tris-(hydromethyl)-aminomethan, 5 % Glycerol, 4 mM EDTA (Sigma, St. Louis, USA), 0,4 % SDS, 0,24 % Tetramethylethylendiamin, 0,2 % Ammoniumpersulfat, pH 6,8.

Für dermale Extrakte wurden 6 % Trenngele und 4 % Sammelgele benutzt.Sie setzten sich folgendermaßen zusammen:

Trenngel 6 %: 6 % Acrylamid-bis (49:1), 0,2 M Tris-(hydromethyl)-aminomethan, 5 % Glycerol, 0,1 M Glycin, 0,4 % SDS, 0,12 % Tetramethylethylendiamin, 0,15 % Ammoniumpersulfat, pH 8,8.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Sammelgele und Trenngele

	Sammelgel 4 %	Trenngel 6 %	Trenngel 7,5 %
H_2O	3,1 ml	4,65 ml	4,15 ml
1,5 M Tris-(hydromethyl)-aminomethan pH 8,8	---	1,35 ml	1,35 ml
0,5 M Tris-(hydromethyl)-aminomethan pH 6,6	700 µl	---	---
30 % Acrylamid-bis (49:1)	650 µl	2 ml	2,5 ml
100 % Glycerol	250 µl	500 µl	500 µl
1 M Glycin	---	1 ml	1 ml
0,5 M EDTA pH 7,0	40 µl	---	---

10 % SDS	200 µl	400 µl	400 µl
Tetramethylethylendiamin	12 µl	12 µl	12 µl
10 % Ammoniumpersulfat	100 µl	150 µl	150 µl

Um die Trennung der Proteine nach deren spezifischem Gewicht und nicht nach Ladungen zu ermöglichen, wurden die bei -80 °C gelagerten Extrakte und der Prestained SDS-PAGE Standard im Verhältnis 5:1 mit der fünffachen SDS(+)-Lösung [0,3 M Tris-(hydromethyl)-aminomethan, 5,9 M Glycerol, 15 mM Bromphenol (Merck, Darmstadt), 3,7 M 2-Merkaptoäthanol (Merck, Darmstadt), pH 6,8] versetzt und dann ggf. bis zur gewünschten Konzentration mit der einfachen SDS(+)-Lösung weiterverdünnt. Vor dem Laden wurden alle Extrakte 2 min bei 100 °C gekocht, um die maximale Entfaltung der Moleküle zu ermöglichen. Danach wurden die Präpgele mit den Extrakten geladen. Die geladenen Gele wurden in Laufpuffer [25 mM Tris-(hydromethyl)-aminomethan, 192 mM Glycin, 1 % SDS, pH 8,3] versenkt. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 mA bei Raumtemperatur (RT) innerhalb 1,5 h. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Extrakte von den Trenngelen auf Nitrozellulosen transferiert. Zu diesem Zwecke wurden die Trenngele auf die Nitrozellulosen gelegt und anschließend zwischen zwei Blättern Wattmanpapier und zwei Faserkissen in spezielle Kassetten eingeklemmt. Die Kassetten wurden anschließend in Transferpuffer [25 mM Tris-(hydromethyl)-aminomethan, 192 mM Glycin, 20 % Methanol (Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland), pH 8,3] versenkt. Der Transfer erfolgte bei 35 V und 150 mA bei 4 °C für 17 h. Daraufhin wurde der Erfolg des Transfers mittels Fast-Green-Färbung [0,1 % Fast Green FSF (Sigma, St. Louis, USA), 10 % Methanol, 5 % Essigsäure] der Nitrozellulosen kontrolliert (RT, 1 min).

Die Nitrocellulosen wurden in Streifen von 2 mm Breite geschnitten und anschließend für 18 h bei 4 °C in 5 % Lösung Magermilchpulver (Merck, Darmstadt) in tris-buffered saline plus tween Puffer (TBST) [0,02 M Tris-(hydromethyl)-aminomethan, 0,15 M NaCl, 0,01 % Tween-20 (Sigma, St.Louis, USA), pH 7,5] geblockt und daraufhin 5 min mit TBST gewaschen. Die Patientenseren wurden 1:50 in 1 % Lösung des bovinen Serumalbumins (BSA)

(Sigma, St. Louis, USA) in TBST verdünnt und auf die geblockten Nitrocellulosestreifen gegeben. Die Inkubation der Nitrocellulosenstreifen mit Primärseren erfolgte 5 h lang bei RT. Die Nitrocellulosestreifen wurden anschließend 40 min mit TBST gewaschen und mit peroxidasekonjugierten Sekundärantikörpern 1 h bei RT inkubiert.

Eine Ausnahme bildeten die Nitocellulosen, die mit Primärseren inkubiert wurden, bei denen die Reaktivität gegen Envo- und Periplakin getestet werden sollte. Hier wurde als Sekundärantikörper ein monoklonaler Maus-anti-Human IgG-Antikörper (Verdünnung 1:4000 mit TBST+1 %BSA) verwendet und erst als dritter Schritt ein peroxidasekonjugierter Tertiärantikörper. Durch den Tertiärantikörper wurde die Empfindlichkeit des Immunoblots verbessert. Nach Abschluss der Inkubation mit Sekundär- bzw. Tertiärantikörpern wurden die Nitrocellulosestreifen nochmals 30 min lang mit TBST gewaschen und anschließend für jeweils 15 sec [Ausnahme: monoklonale Sekundärantikörper gegen die IgG-Subklassen (30 sec)] mit Diaminobenzidin (DAB)-Lösung (Merck, Darmstadt) versetzt. Durch Interaktion der an den Sekundär- bzw. Tertiärantikörpern gekoppelten Peroxidase und DAB wurde die Antigen-Antikörperreaktion zwischen den Primärseren und den in den Extrakten enthaltenen Antigenen als braune Farbreaktion sichtbar.

Außerdem führten wir den Immunoblot auch nach der Beschreibung von Hashimoto et al, 1990, aus. Dabei wurden die Patientenseren 1:10 verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um bei dieser niedrigen Verdünnung Serum zu sparen, wurden die Nitrocellulosestreifen auf eine Glasplatte gelegt, die mit Parafilm (American National Can. Menasha, WI) überzogen war, und anschließend mit 100 µl verdünntem Serum überzogen. Die weitere Durchführung unterschied sich nicht von der oben beschriebenen.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Extrakte kultivierter Keratinozyten unter Verwendung von poly- und monoklonalen Antikörpern mit bekannter Spezifität

Zur Charakterisierung der Extrakte kultivierter Keratinozyten inkubierten wir einzelne Nitrozellulosestreifen mit verschiedenen polyklonalen und monoklonalen Antikörperseren. Hierfür benutzten wir polyklonale Antikörper gegen Desmoplakin, Desmocollin 1 (JCMC), den C-Terminus von BP180 (R136), die NC16A Domäne von BP180 (SA8009), BP230 und Laminin 5, sowie monoklonale Antikörper gegen die β_4-Untereinheit des $\alpha_6\beta_4$-Integrins und Kollagen Typ VII (LH7.2). Die Ergebnisse der Analyse sind in **Abbildung 5** dargestellt.

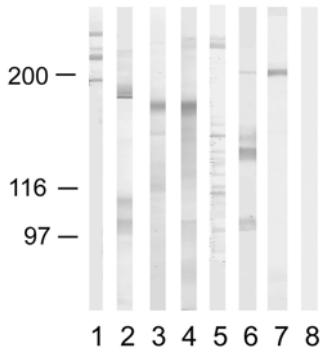

Abb. 5: Charakterisierung der kultivierten Keratinozytenextrakte unter Verwendung von poly- und monoklonalen Antikörpern. Die einzelnen Nitrozellulosestreifen wurden mit verschiedenen polyklonalen und monoklonalen Antikörperseren inkubiert. Polyklonale Antikörper gegen Desmoplakin erkannten 250 kDa, 210 kDa und 190 kDa schwere Proteine (Spur 1). JCMC, ein polyklonaler Antikörper gegen Desmocollin 1, reagierte mit Proteinbanden von 110 kDa und 105 kDa (Spur 2). R136, ein polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus von BP180, erkannte ein 180 kDa schweres Protein (Spur 3). Mit einer Proteinbande von 180 kDa reagierte auch SA8009, ein polyklonaler Antikörper gegen die NC16A-Domäne von BP180 (Spur 4). Polyklonale Antikörper gegen BP230 zeigten eine Proteinbande bei 230 kDa (Spur 5). Proteine mit einem Molekulargewicht von 200 kDa, 140 kDa und 105 kDa (Spur 6) wurden von polyklonalen Antikörper gegen Laminin 5 erkannt. Monoklonale Antikörper gegen die β_4-Untereinheit des $\alpha_6\beta_4$-Integrins reagierten mit einer 205 kDa schweren Proteinbande (Spur 7). LH7.2, ein monoklonaler Antikörper gegen Kollagen Typ VII zeigte keine Reaktivität (Spur 8). Auf der linken Seite sind die Positionen der Molekulargewichtsmarker in kDa angezeigt.

Polyklonale Antikörper gegen Desmoplakin erkannten 250 kDa (Desmoplakin 1), 210 kDa (Desmoplakin 2/Envoplakin) und 190 kDa (Periplakin) schwere Proteine, JCMC reagierte mit Proteinbanden von 110 kDa (Desmocollin 1) und 105 kDa (Desmocollin 1). R136 und SA8009 markierten beide eine Proteinbande bei 180 kDa (BP180). Ein 230 kDa (BP230) schweres Protein wurde von polyklonalen Antikörpern gegen BP230 erkannt. Polyklonale Antikörper gegen Laminin 5 reagierten mit Proteinbanden bei 200 kDa (nicht-prozessierte α_3-Kette), 140 kDa (nicht-prozessierte β_3-Kette) und 105 kDa (prozessierte γ_2-Kette). Monoklonale Antikörper gegen die β_4-Untereinheit des $\alpha_6\beta_4$-Integrins erkannten ein 205 kDa (β_4-Integrin) schweres Protein. LH 7.2 zeigte keine Reaktivität mit den Extrakten kultivierter Keratinozyten.

4.2 Nachweis von Autoantikörpern in Patientenseren mittels Immunoblot von Extrakten kultivierter Keratinozyten

Wir untersuchten die Reaktivität der Seren von Patienten mit verschiedenen Autoimmundermatosen mit Extrakten kultivierter Keratinozyten mittels Immunoblot. Darunter befanden sich 78 Patienten mit bullösem Pemphigoid, 18 Patienten mit Pemphigoid gestationis, 11 Patienten mit Schleimhautpemphigoid, 6 Patienten mit Pemphigus vulgaris, 2 Patienten mit Pemphigus foliaceus und 5 Patienten mit Paraneoplastischem Pemphigus. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 5** dargestellt. **Abbildung 6** zeigt repräsentative Beispiele der beobachteten Reaktivitätsmuster.

Tabelle 5: Reaktivität der Autoantikörper von Patienten mit verschiedenen bullösen Autoimmundermatosen mit Antigenen in Extrakten kultivierter Keratinozyten.

	BP	**PG**	**MMP**	**PV**	**PF**	**PNP**
BP180	46/78	16/18	1/11	0/6	0/2	0/5
BP230	39/78	3/18	0/11	0/6	0/2	0/5
Laminin 5	0/78	0/18	3/11	0/6	0/2	0/5
β_4-Integrin	0/78	0/18	0/11	0/6	0/2	0/5
Desmoglein1	0/78	0/18	0/11	1/6	2/2	0/5
Desmoglein3	0/78	0/18	0/11	5/6	0/2	0/5
Envoplakin	0/78	0/18	0/11	0/6	0/2	3/5
Periplakin	0/78	0/18	0/11	0/6	0/2	2/5
Desmoplakin	0/78	0/18	0/11	0/6	0/2	2/5
Σ positiver Seren	63/78	16/18	4/11	5/6	2/2	5/5
Σ in Prozent	80,1%	88,9%	36,4%	83,3%	100%	100%

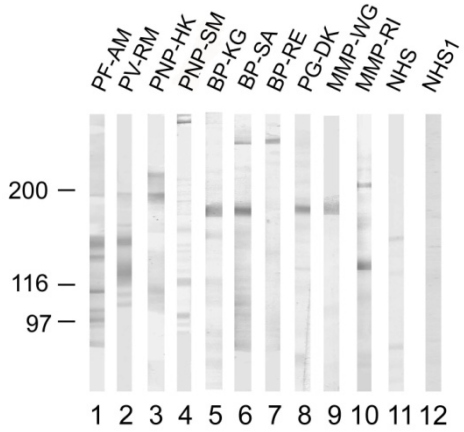

Abb. 6: Nachweis von Autoantikörpern in Patientenseren mittels Immunoblot von Extrakten kultivierter Keratinozyten. Die Nitrocellulosestreifen wurden mit Seren von Patienten mit verschiedenen Autoimmundermatosen inkubiert: Das Serum von einem Patienten mit Pemphigus foliaceus (PF-AM) erkannte eine Proteinbande von 160 kDa (Spur 1), Antikörper von einem Patienten mit Pemphigus vulgaris (PV-RM) zeigte Reaktivität mit 130 kDa und 160 kDa schweren Proteinen (Spur 2). Die Seren von Patienten mit paraneoplastischem Pemphigus (PNP-HK, PNP-SM) reagierten mit Proteinen mit einem Molekulargewicht von 210 kDa, 190 kDa (Spur 3) und 250 kDa (Spur 4). Die Antikörper von Patienten mit bullösem Pemphigoid (BP-KG, BP-SA, BP-RE) erkannten 180 kDa (Spur 5 und 6) und 230 kDa (Spur 6 und 7) schwere Proteine.

Eine 180 kDa schwere Proteinbande (Spur 8) wurde ebenfalls von der Patientin mit Pemphigoid gestationis (PG-DK) erkannt. Patienten mit Schleimhautpemphigoid (MMP-WG, MMP-RI) reagierten mit 180 kDa (Spur 9), 200 kDa, 140 kDa und etwas schwächer auch mit 165 kDa (Spur 10) schweren Proteinen. Seren von gesunden Kontrollpersonen (NHS) zeigten keine Reaktivität (Spur 11 und 12). Auf der linken Seite sind die Positionen der Molekulargewichtsmarker in kDa angezeigt.

95 (79,2 %) von 120 getesteten Patienten mit Autoimmundermatosen reagieren mit Antigenen in kultivierten Keratinozytenextrakten. 63 von 78 Patienten mit BP und 16 von 18 Patienten mit PG erkannten entweder BP180 oder BP230. Fünf von 6 Patienten mit PV reagierten mit Desmoglein 3, einer davon zusätzlich noch mit Desmoglein 1. Beide getesteten Seren von Patienten mit PF zeigten eine Reaktivität mit Desmoglein 1. Alle 5 Patienten mit PNP reagierten positiv. Zwei erkannten sowohl Envoplakin als auch Periplakin, einer nur Envoplakin und die beiden anderen reagierten mit Desmoplakin. Von den Patienten mit MMP zeigten nur 4 von 11 Patienten Reaktionen mit kultivierten Keratinozytenextrakten. Ein Patient reagierte mit BP180 und 3 mit der nicht-prozessierten α_3-Kette und prozessierten γ_2-Kette von Laminin 5.

4.3 Optimierung des Nachweises von Autoantikörpern gegen Laminin 5

Da die Reaktivität der Seren von Patienten mit Schleimhautpemphigoid mit Extrakten kultivierter Keratinozyten nicht befriedigend war, war es das Ziel weiterer Experimente den Nachweis von Autoantikörpern gegen Laminin 5 zu optimieren.

Dazu führten wir zunächst Immunoblotuntersuchungen mit fünf verschiedenen Extrakten [extrazelluläre Matrix von kultivierten Keratinozyten (ECM), aufgereinigtes Laminin 5 (Ln5), Extrakt kultivierter Keratinozyten (KC), Extrakt kultivierter Fibroblasten (FE) und konzentrierten Überstand von kultivierten Keratinozyten (HaCaT-Überstand)], die jeweils mit einem polyklonalen Antikörper gegen Laminin 5 (Rabbit-Anti-Laminin5) inkubiert wurden **(Abbildung 7a)**.

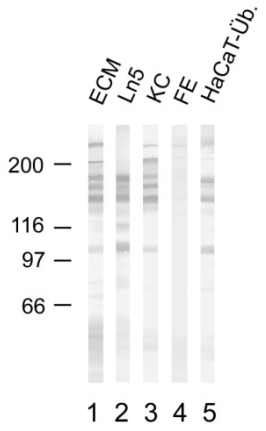

Abb. 7a: Optimierung des Nachweises von Autoantikörpern gegen Laminin 5 mit einem polyklonalen Antikörper. Die 5 verschiedenen Extrakte [extrazelluläre Matrix von kultivierten Keratinozyten(ECM), aufgereinigtes Laminin 5 (Ln5), Extrakt kultivierter Keratinozyten (KC), Extrakt kultivierter Fibroblasten (FE) und konzentrierter Überstand von kultivierten Keratinozyten (HaCaT-Überstand)] wurden im Immunoblot mit einem polyklonalen Antikörper gegen Laminin 5 (Rabbit-Anti-Laminin5) inkubiert. Das Serum erkannte Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 165 kDa (prozessierte α_3-Kette), 140 kDa (nicht-prozessierte β_3-Kette) und 105 kDa (prozessierte γ_2-Kette) in allen getesteten Extrakten mit Ausnahme des Extraktes kultivierter Fibroblasten, wobei die Reaktivität gegen das 105 kDa schwere Protein in der extrazellulären Matrix und im Extrakt kultivierter Keratinozyten schwächer war als in den beiden anderen Extrakten. Andererseits konnten in der extrazellulären Matrix und im Extrakt kultivierter Keratinozyten zusätzlich noch 200 kDa (nicht-prozessierte α_3-Kette) und 150 kDa (nicht-prozessierte γ_2-Kette) schwere Proteine nachgewiesen werden. Im Extrakt kultivierter Fibroblasten wurde keines der Proteine nachgewiesen werden.

Das Serum reagierte in allen Extrakten, mit Ausnahme des Extraktes kultivierter Fibroblasten, mit 165 kDa (prozessierte α_3-Kette), 140 kDa (nicht-prozessierte β_3-Kette) und 105 kDa (prozessierte γ_2-Kette) schweren Proteinen. In der extrazellulären Matrix und im Extrakt kultivierter Keratinozyten konnten zusätzlich noch Proteinbanden von 200 kDa (nicht-prozessierte α_3-Kette) und 150 kDa (nicht-prozessierte γ_2-Kette) nachgewiesen werden.

Anschließend inkubierten wir die fünf Extrakte mit dem Serum eines Patienten mit Schleimhautpemphigoid **(Abbildung 7b)**.

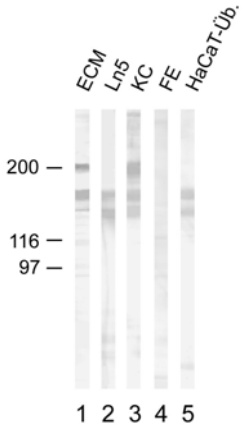

Abb. 7b: Optimierung des Nachweises von Autoantikörpern gegen Laminin 5 mit dem Serum eines Patienten mit Schleimhautpemphigoid. Die fünf verschiedenen Extrakte wurden mit einem Patientenserum inkubiert. Das Serum erkannte die 165 kDa- (prozessierte α_3-Kette) und die 140 kDa (nicht-prozessierte β_3-Kette) schwere Proteinbande in allen Extrakten, mit Ausnahme des Extraktes kultivierter Fibroblasten. Das 200 kDa (nicht-prozessierte α_3-Kette) schwere Protein wurde wiederum nur in der extrazellulären Matrix und in den Extrakten kultivierter Keratinozyten gefunden. Im Vergleich zum polyklonalen Antikörper (a) reagierte das Patientenserum nicht mit den 105 kDa (prozessierte γ_2-Kette) und 150 kDa (nicht-prozessierte γ_2-Kette) schweren Proteinen. Das Extrakt kultivierter Fibroblasten zeigte auch mit dem Patientenserum keine Reaktivität mit den Proteinen. Auf der linken Seite sind die Positionen der Molekulargewichtsmarker in kDa angezeigt.

Das Patientenserum reagierte in allen Extrakten, mit Ausnahme des Extraktes kultivierter Fibroblasten, mit Proteinbanden von 165 kDa (prozessierte α_3-Kette) und 140 kDa (nicht-prozessierte β_3-Kette). In der extrazellulären Matrix und im konzentrierten Überstand kultivierter Keratinozyten war die Reaktivität mit der nicht-prozessierten β_3-Kette etwas schwächer als in aufgereinigtem Laminin 5 und im Extrakt kultivierter Keratinozyten. Mit der prozessierten α_3-Kette war die Reaktivität in allen Extrakten gleich stark. Zusätzlich erkannte das Serum in der extrazellulären Matrix und in den Extrakten kultivierter Keratinozyten ein 200 kDa (nicht-prozessierte α_3-Kette) schweres Protein. Im Extrakt kultivierter Fibroblasten konnte weder mit dem polyklonalen Antikörper noch mit dem Patientenserum ein Protein nachgewiesen werden. Da man in der extrazellulären Matrix und im Extrakt kultivierter Keratinozyten 3 Ketten des Laminin 5 nachweisen konnte, konzentrierten wir uns in den weiteren Versuchen zur Nachweisoptimierung von Laminin 5 auf diese beiden Extrakte.

4.4 Charakterisierung der IgG_4-Reaktivität gegen Laminin 5 mit verschiedenen Extrakten

Da IgG_4 der vorherrschende Autoantikörper in Seren von Patienten mit Anti-Laminin5-Schleimhautpemphigoid ist (Hsu et al, 1997), untersuchten wir zur weiteren Nachweisoptimierung extrazelluläre Matrix, konzentrierten Überstand von kultivierten Keratinozyten und das Extrakt kultivierter Keratinozyten auf IgG_4-Reaktivität gegen Laminin 5. Wir verglichen dabei jeweils Seren von zwei Patienten mit Schleimhautpemphigoid und ein Kontrollserum von einem gesunden Spender.

In extrazellulärer Matrix zeigten beide Patienten starke Reaktivität mit einem 165 kDa (prozessierte α_3-Kette) und weniger stark mit einem 200 kDa (nicht-prozessierte α_3-Kette) schweren Protein. Ein Patientenserum erkannte zusätzlich noch eine Proteinbande von 140 kDa (nicht-prozessierte β_3-Kette) (**Abbildung 8**). Im Vergleich dazu zeigten die beiden anderen Extrakte nur bei einem Patientenserum eine Reaktivität mit den Proteinen.

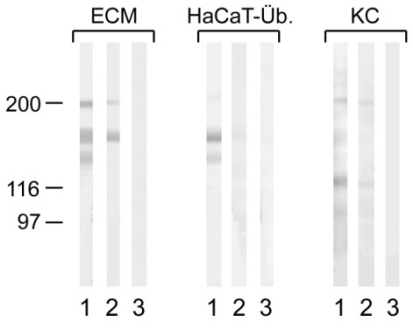

Abb. 8: Testung der IgG_4-Reaktivität gegen Laminin 5 mit verschiedenen Extrakten. Drei verschiedene Extrakte [Extrazelluläre Matrix (ECM), konzentrierter Überstand von kultivierten Keratinozyten (HaCaT-Überstand) und Extrakt kultivierter Keratinozyten (KC)] wurden jeweils mit dem Serum von zwei Patienten mit Anti-Laminin5-Schleimhautpemphigoid (Spur 1 und 2) und einem Kontrollserum von einem gesunden Spender (Spur 3) inkubiert. Anschließend wurden die Nitrocellulosestreifen mit einem Peroxidase-markierten monoklonalen Antikörper gegen IgG4 inkubiert, um die IgG_4-Reaktivität gegen Laminin 5 zu erkennen. In extrazellulärer Matrix zeigten beide Patienten starke Reaktivität mit einem 165 kDa (prozessierte α_3-Kette) und weniger stark mit einem 200 kDa (nicht-prozessierte α_3-Kette) schweren Protein. Ein Patientenserum erkannte zusätzlich noch eine Proteinbande von 140 kDa (nicht-prozessierte β_3-Kette) (Spur 1). Im Vergleich dazu, zeigte sich bei den beiden anderen Extrakten (HaCaT-Überstand und KC) nur bei einem Patientenserum (Spur 1) eine Reaktivität mit den Proteinen. Jedoch konnte im Extrakt kultivierter Keratinozyten als einziges eine Reaktivität gegen ein 105 kDa (prozessierte γ_2-Kette) schweres Protein gefunden werden. Mit allen drei Extrakten blieben die Kontrollseren negativ. Auf der linken Seite sind die Positionen der Molekulargewichtsmarker in kDa angezeigt.

4.5 Charakterisierung der Autoantikörper in Seren von Patienten mit Schleimhautpemphigoid mittels extrazellulärer Matrix

Die Seren von 10 Patienten mit Schleimhautpemphigoid wurden auf IgG_4-Reaktivität gegen Laminin 5 mit extrazellulärer Matrix getestet. Sieben Seren wiesen in der indirekten Immunfluoreszenz eine Bindung der Autoantikörper an der dermalen Seite auf, die indirekte Immunfluoreszenz der restlichen drei Seren war negativ.

Mit 8 Patientenseren konnten eine oder mehrere Ketten des Laminin 5 nachgewiesen werden (Spur 1-8), zwei Patientenseren und die Kontrollseren von gesunden Patienten blieben dagegen negativ (Spur 9-13) (**Abbildung 9**).

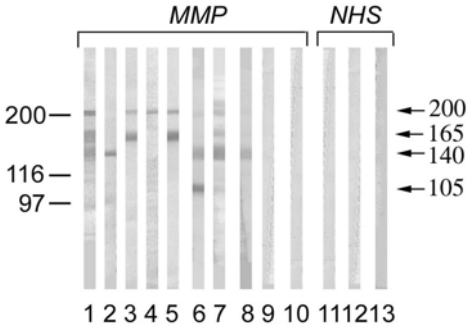

Abb. 9: Charakterisierung der Autoantikörper in Seren von Patienten mit Schleimhautpemphigoid mittels Immunoblot mit extrazellulärer Matrix. Zehn verschiedene Seren von Patienten mit Schleimhautpemphigoid und drei Kontrollseren von gesunden Personen wurden auf IgG_4-Reaktivität gegen Laminin 5 in extrazellulärer Matrix getestet. Bei acht Patientenseren (Spur 1-8) konnte eine Reaktivität gegen eine oder mehrere Ketten des Laminin 5 gefunden werden, zwei Patientenseren und die Kontrollseren (Spur 9-13) waren negativ. Auf der linken Seite sind die Positionen der Molekulargewichtsmarker in kDa angezeigt, auf der rechten Seite die Positionen der einzelnen Laminin 5-Ketten [α3 = nicht-prozessierte α_3-Kette (200 kDa), α3p = prozessierte α_3-Kette (165 kDa), β3 = nicht-prozessierte β_3-Kette (140 kDa), γ2p = prozessierte γ_2-Kette (105 kDa)]

4.6 Charakterisierung der IgG-Subklassen der Autoantikörper von Patienten mit Schleimhautpemphigoid mit extrazellulärer Matrix

Baikan et al berichteten über einen Patienten mit ausschließlicher IgG_3-Reaktivität gegen Laminin 5 (Baikan et al, 2005). Wir untersuchten deshalb die beiden Patienten mit Schleimhautpemphigoid, die keine IgG_4-Reaktivität gezeigt hatten (MMP-2 + MMP-3), hinsichtlich Reaktivität anderer IgG-Subklassen mit extrazellulärer Matrix. Zusätzlich testeten wir als Kontrolle einen Patienten mit

Schleimhautpemphigoid, der eine IgG_4-Reaktivität gezeigt hatte (MMP-1) und eine gesunde Kontrollperson. Die beiden Seren zeigten ausschließlich eine IgG_3- (MMP-2) oder IgG_1-Reaktivität (MMP-3). Im ersten Patientenserum (MMP-1) konnten IgG_1-, IgG_2- und IgG_4-Autoantikörper nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 6** und in **Abbildung 10** dargestellt.

Tabelle 6: IgG-Subklassen erkennen Ketten des Laminin 5 in extrazellulärer Matrix ($p\alpha_{3:}$ prozessierte α_3-Kette (165 kDa), $np\alpha_{3:}$ nicht-prozessierte α_3-Kette (200 kDa), $np\beta_{3:}$ prozessierte β_3-Kette (140 kDa)

	IgG_1	IgG_2	IgG_3	IgG_4
MMP-1	$p\alpha_3$	$p\alpha_3$	-	$np\alpha_3$, $p\alpha_3$, $np\beta_3$
MMP-2	-	-	$p\alpha_3$, $np\beta_3$	-
MMP-3	$p\alpha_3$	-	-	-
NHS-4	-	-	-	-

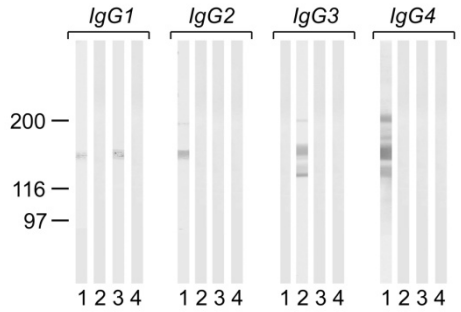

Abb. 10: Charakterisierung der IgG-Subklassen der Autoantikörper von Patienten mit Schleimhautpemphigoid mit extrazellulärer Matrix. Zur Charakterisierung der IgG-Subklassen der Autoantikörper von Patienten mit Schleimhautpemphigoid wurden drei Patienten mit Schleimhautpemphigoid (Spur 1-3) und eine gesunde Kontrollperson (Spur 4) getestet. Der Immunoblot wurde mit extrazellulärer Matrix durchgeführt. Zuerst wurden die Nitrocellulosestreifen mit Patientenserum bzw. Kontrollserum und anschließend mit Peroxidase-markierten monoklonalen Antikörpern gegen IgG_1, IgG_2, IgG_3 und IgG_4 inkubiert. Das erste Patientenserum (Spur 1) zeigte eine IgG_1-, IgG_2- und vor allem eine starke IgG_4-Reaktivität mit einem 165 kDa (prozessierte α_3-Kette) schweren Protein. Die IgG_4-Autoantikörper erkannten zusätzlich noch Proteinbanden von 200 kDa (nicht-prozessierte α_3-Kette) und 140 kDa (nicht-prozessierte β_3-Kette). Das zweite Patientenserum (Spur 2) hatte ausschließlich IgG_3-Reaktivität mit den 165 kDa und 140 kDa Proteinbanden, der dritte Patient (Spur 3) zeigte dagegen nur IgG_1-Reaktivität mit dem 165 kDa schweren Protein. Das Kontrollserum (Spur 4) zeigte keinerlei Reaktivität. Auf der linken Seite sind die Positionen der Molekulargewichtsmarker in kDa angezeigt.

4.7 Testung verschiedener Extrakte hinsichtlich des Nachweises der β_4-Untereinheit des $\alpha_6\beta_4$-Integrins mit einem monoklonalen Antikörper

Vier verschiedene Extrakte [dermales Extrakt (DE), Extrakt kultivierter Fibroblasten (FE), Extrakt kultivierter Keratinozyten (KC) und extrazelluläre Matrix (ECM)] wurden mittels Immunoblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen die β_4-Untereinheit des $\alpha_6\beta_4$-Integrins untersucht (**Abbildung 11**).

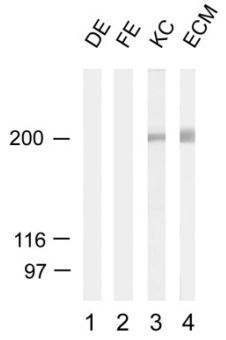

Abb. 11: Testung verschiedener Extrakte hinsichtlich des Nachweises der β_4-Untereinheit des $\alpha_6\beta_4$-Integrins mit einem monoklonalen Antikörper. Vier verschiedene Extrakte [Dermales Extrakt (DE), Extrakt kultivierter Fibroblasten (FE), Extrakt kultivierter Keratinozyten (KC) und extrazelluläre Matrix (ECM)] wurden mit einem monoklonalen Antikörpern gegen die β_4-Untereinheit des $\alpha_6\beta_4$-Integrin inkubiert. Die Antikörper erkannten ein 205 kDa (β_4-Untereinheit) schweres Protein im Extrakt kultivierter Keratinozyten (KC) und noch stärker in der extrazellulären Matrix (ECM). Das dermale Extrakt und das Extrakt kultivierter Fibroblasten blieben negativ. Auf der linken Seite sind die Positionen der Molekulargewichtsmarker in kDa angezeigt.

Die Antikörper reagierten mit einer Proteinbande bei 205 kDa (β_4-Untereinheit) im Extrakt kultivierter Keratinozyten und in extrazellulärer Matrix, wobei die Reaktivität mit extrazellulärer Matrix etwas stärker war. Keine Reaktivität fand sich mit dermalem Extrakt und Extrakt kultivierter Fibroblasten.

4.8 Nachweis von Autoantikörpern gegen die β_4-Untereinheit des $\alpha_6\beta_4$-Integrins im Serum von Patienten mit Schleimhautpemphigoid mittels Immunoblot mit extrazellulärer Matrix

Wir untersuchten die Seren von 12 Patienten mit Schleimhautpemphigoid auf Reaktivität gegen die β_4-Untereinheit des $\alpha_6\beta_4$-Integrins mittels Immunoblot mit extrazellulärer Matrix. 6 Seren wiesen in der indirekten Immunfluoreszenz eine

Bindung der Antikörper im Blasendach auf, die restlichen 6 Patientenseren waren in der indirekten Immunfluoreszenz negativ.

Drei der Seren, die in der indirekten Immunfluoreszenz positiv waren, reagierten ausschließlich mit einem 205 kDa schweren Protein. Die restlichen Patientenseren reagierten nicht mit diesem Protein. Das Kontrollserum war ebenfalls negativ (**Abbildung 12**).

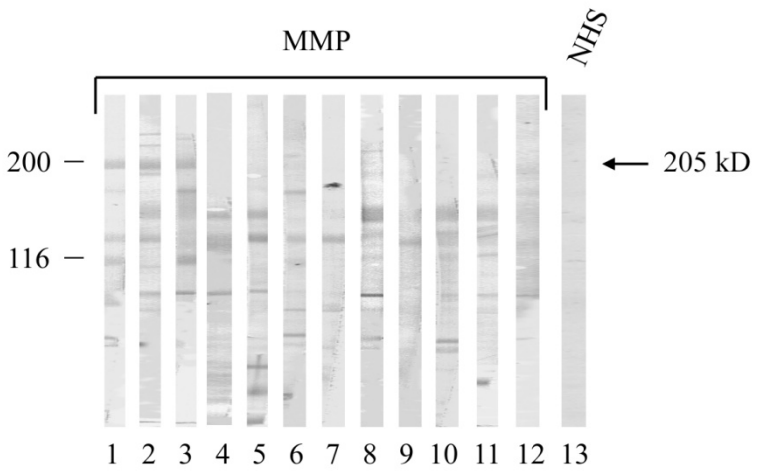

Abb. 12: Nachweis von Autoantikörpern gegen die β_4-Untereinheit des $\alpha_6\beta_4$-Integrins im Serum von Patienten mit Schleimhautpemphigoid mittels Immunoblot mit extrazellulärer Matrix. Die Nitrozellulosestreifen mit extrazellulärer Matrix als Substrat wurden mit Seren von 12 Patienten mit Schleimhautpemphigoid und einem Kontrollserum eines gesunden Spenders inkubiert (Spur 13). Die Seren von 6 Patienten zeigten in der indirekten Immunfluoreszenz eine epidermale Bindung der Antikörper (Spur 1-6), die anderen sechs Seren waren in der indirekten Immunfluoreszenz negativ (7-12). Von den 12 Patientenseren zeigten nur drei (Spur 1-3) eine Reaktivität mit einem 205 kDa (β_4-Untereinheit des $\alpha_6\beta_4$-Integrin) schweren Protein. Es handelt sich um Seren, die in der indirekten Immunfluoreszenz ebenfalls eine Reaktivität gezeigt hatten. Das Kontrollserum blieb negativ. Auf der rechten Seite ist die Position der 205 kDa Proteinbande durch einen Pfeil gekennzeichnet, auf der linken Seite sind die Positionen der Molekulargewichtsmarker in kDa angezeigt.

4.9 Testung verschiedener Extrakte hinsichtlich des Nachweises von Typ VII Kollagen mit einem monoklonalen Antikörper

Sechs verschiedene Extrakte [rekombinante Form der vollen Länge der NC1-Domäne des Typ VII Kollagen (NC1, FL), konzentrierter Überstand von kultivierten Keratinozyten (HaCaT-Üb.), Extrakt kultivierter Keratinozyten (KC),

extrazelluläre Matrix (ECM), Extrakt kultivierter Fibroblasten (FE) und dermales Extrakt (DE)] wurden mit dem monoklonalen Antikörper (LH7.2) gegen Kollagen Typ VII inkubiert.

Der Antikörper reagierte mit der 145 kDa schweren rekombinanten NC1-Domäne des Kollagen Typ VII und erkannte diese Domäne auch im konzentrierten Überstand kultivierter Keratinozyten sowie im dermalen Extrakt. Im konzentrierten Überstand kultivierter Keratinozyten und im dermalen Extrakt reagierte der Antikörper zusätzlich mit einer Proteinbande bei 290 kDa (volle Länge von Typ VII Kollagen). Der monoklonale Antikörper zeigte keine Reaktivität mit extrazellulärer Matrix, dem Extrakt kultivierter Keratinozyten und dem Extrakt kultivierter Fibroblasten (**Abbildung 13)**.

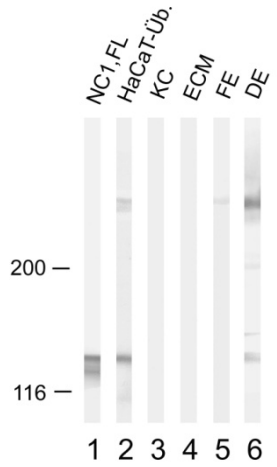

Abb. 13: Testung verschiedener Extrakte hinsichtlich des Nachweises von Typ VII Kollagen mit einem monoklonalen Antikörper. Sechs verschiedene Extrakte [rekombinante Form der vollen Länge der NC1-Domäne des Kollagen Typ VII (NC1, FL), konzentrierter Überstand von kultivierten Keratinozyten (HaCaT-Üb.), Extrakt kultivierter Keratinozyten (KC), extrazelluläre Matrix (ECM), Extrakt kultivierter Fibroblasten (FE) und dermales Extrakt (DE)] wurden mit dem monoklonalen Antikörper (LH7.2) gegen Typ VII Kollagen inkubiert. LH7.2 erkannte in der rekombinanten Form der NC1-Domäne des Kollagen Typ VII (NC1, FL), im konzentrierten Überstand von kultivierten Keratinozyten (HaCaT-Üb.) und im dermalen Extrakt ein Protein mit einem Molekulargewicht von 145 kDa (NC1-Domäne), im dermalen Extrakt und im konzentrierten Überstand von kultivierten Keratinozyten zusätzlich noch eine Proteinbande von 290 kDa (Kollagen Typ VII). Auf der linken Seite sind die Positionen der Molekulargewichtsmarker in kDa angezeigt.

4.10 Vergleich der Reaktivität von Autoantikörpern von Patienten mit Epidermolysis bullosa acquisita gegen Kollagen Typ VII aus dermalem Extrakt und aus konzentriertem Überstand kultivierter Keratinozyten

Das Serum von zwei Patienten mit Epidermolysis bullosa acquisita und ein Kontrollserum wurde auf Reaktivität gegen Kollagen Typ VII mit dermalem Extrakt und konzentriertem Überstand von kultivierten Keratinozyten untersucht.

Die Autoantikörper beider Patientenseren reagierten in beiden Extrakten sowohl mit einem 290 kDa als auch mit einem 145 kDa schweren Protein. Das Kontrollserum blieb negativ (**Abbildung 14**).

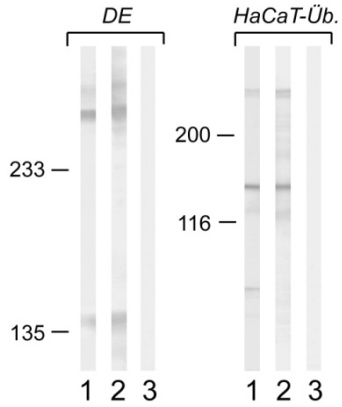

Abb. 14: Vergleich der Reaktivität von Autoantikörpern von Patienten mit Epidermolysis bullosa acquisita gegen Kollagen Typ VII aus dermalem Extrakt und aus konzentriertem Überstand kultivierter Keratinozyten. Die erste und zweite Spur wurde jeweils mit einem Serum von einem Patienten mit Epidermolysis bullosa acquisita und die dritte Spur mit dem Serum einer gesunden Kontrollperson inkubiert. Mit beiden Extrakten konnte man Autoantikörper sowohl gegen ein 290 kDa (Kollagen Typ VII), als auch gegen ein 145 kDa (NC1-Domäne) schweres Protein nachweisen (Spur 1 und 2). Das Kontrollserum zeigte keine Reaktivität (Spur 3). Auf der linken Seite sind die Positionen der Molekulargewichtsmarker in kDa angezeigt.

5. Diskussion

Diese Arbeit befasst sich mit der Optimierung des Immunoblot-Nachweises von Autoantikörpern bei Blasen bildenden Autoimmundermatosen. In der Vergangenheit beschäftigten sich bereits mehrere Forschungsgruppen mit der Suche nach einem geeigneten Extrakt, mit dem möglichst viele Autoantigene nachgewiesen werden können. Frühere Studien zeigten, dass durch Immunoblotverfahren mit epidermalen und dermalen Extrakten eine definitive Diagnose der Blasen bildenden Autoimmundermatosen möglich ist. Zur Herstellung dieser Extrakte ist eine Trennung der Epidermis von der Dermis notwendig. Dies gelingt durch eine Inkubation in Ethylendiamintetraacetat (EDTA) oder durch Hitze. Der Nachteil dieser Verfahren ist, dass durch Denaturierung der Proteine teilweise Antigene verloren gehen (Ohata et al, 1995). Ein Extrakt aus kultivierten A431 Epidermoidzellen überwand dieses technische Problem (Lee, 2000), jedoch benötigt die Herstellung dieses Substrats besondere Einrichtungen zur Zellkultivierung, die nicht in jedem Routinelabor vorhanden sind. Humanes Amnionextrakt und ein Lysat aus Rinder-Gingiva sind weitere gute Antigenquellen zum Nachweis von Autoantikörpern bei bullösen Autoimmundermatosen und sind bei der Herstellung weniger aufwendig (Oyama et al, 2003; Engineer et al, 2000). Sowohl mit A431 Zellen als auch mit humanem Amnionextrakt und dem Lysat aus Rinder-Gingiva konnte eine Reaktivität der Seren von Patienten mit Blasen bildenden Autoimmundermatosen mit desmosomalen Proteinen sowie mit BP180 und BP230 gezeigt werden (Lee, 2000; Oyama et al, 2003, Engineer et al, 2000). In den Untersuchungen mit A431-Zellen und dem humanen Amnionextrakt wurden auch Patienten mit Epidermolysis bullosa acquisita getestet. Mit beiden Substraten gelang der Nachweis von Kollagen Typ VII. Autoantikörper von Patienten mit Schleimhautpemphigoid erkannten im Lysat aus Rinder-Gingiva ein 205 kDa schweres Protein, das dem β_4-Integrin entspricht.

Anhand unserer Daten können wir zeigen, dass Extrakte kultivierter Keratinozyten geeignet sind, viele der hauptverantwortlichen Autoantikörper bei Blasen bildenden Autoimmundermatosen unter Verwendung nur eines Extrakts nachzuweisen. Es wurden insgesamt 120 Patienten mit bullösen Autoimmundermatosen sowie 20 Patienten, die nicht an einer bullösen Autoimmundermatose erkrankt waren, untersucht. Die Patienten mit bullösen Autoimmundermatosen setzten sich aus 78 Patienten mit BP, 18 Patientinnen mit PG, 11 Patienten mit MMP, 6 Patienten mit PV, 2 Patienten mit PF und 5 Patienten mit PNP zusammen. Mit Hilfe der Extrakte kultivierter Keratinozyten gelang der Nachweis von Autoantikörpern gegen BP180, BP230, Laminin 5, Desmoglein 1 und 3 sowie Envo-, Peri-, und Desmoplakin. β_4-Integrin wurde von einem monoklonalen Antikörper gegen β_4-Integrin erkannt, jedoch nicht von Patientenseren. Patienten mit Epidermolysis bullosa acquisita wurden nicht mit in das untersuchte Patientengut aufgenommen, da im Vorfeld kein Nachweis von Kollagen Typ VII mit Hilfe des monoklonalen Antikörper gegen Kollagen Typ VII (LH 7.2) gelang. Von den 120 getesteten Patienten reagierten 95 Patientenseren mit Antigenen in Extrakten kultivierter Keratinozyten (siehe Tabelle 5). 80 % der Seren von Patienten mit BP erkannten entweder BP180 oder BP230. 89 % der Patienten mit PG reagierten ebenfalls mit BP180 seltener auch mit BP230. Fünf von 6 Seren von Patienten mit PV erkannten Desmoglein 3, einer davon zusätzlich Desmoglein 1. Beide getesteten Patienten mit PF reagierten mit Desmoglein 1. Alle fünf Patienten mit PNP zeigten eine Reaktivität mit Envo-, Peri- oder Desmoplakin. 36 % der Patienten mit Schleimhautpemphigoid reagierten entweder mit Laminin 5 oder BP180. Die Patienten, die nicht an einer bullösen Autoimmundermatose erkrankt waren, zeigten keine Reaktion mit einem dieser Antigene.

In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, das Extrakte kultivierter Keratinozyten, die in einem Milieu mit niedrigem Calciumgehalt kultiviert wurden, ein geeignetes Substrat zum Nachweis von BP180, BP230, Desmoplakin, Envoplakin, Periplakin und Laminin 5 darstellt. (Pas, 2001; Batteux et al, 1997). Die Synthese von Kollagen Typ VII sowie Desmoglein 1 und 3 war unter diesen Bedingungen zu niedrig. Durch Erhöhung der

Calciumkonzentration und Hinzunahme von Mitomycin-behandelten 3T3-Zellen, die dermale Faktoren liefern, konnte die Synthese dieser Antigene gesteigert werden. (Batteux et al, 1997). Unser Extrakt kultivierter Keratinozyten wurde in einem Milieu mit niedrigem Calciumgehalt kultiviert. Trotz niedriger Calciumkonzentration war ein Nachweis von Desmoglein 1 und 3 möglich. Der Nachweis von Kollagen Typ VII gelang mit unserem Extrakt kultivierter Keratinozyten nicht, was durch das Fehlen der dermalen Faktoren bei der Kultivierung erklärbar ist (Batteux et al, 1997).

Aus früheren Arbeiten wissen wir, dass Autoantiköper von Patienten mit Epidermolysis bullosa aquisita mit einem 290 kDa schwerem Protein in dermalen Extrakten reagieren (Woodley et al, 1984, Woodley et al, 1988). Wie bereits erwähnt, konnte Kollagen Typ VII auch mit A431 Epidermoidzellen und mit humanem Amnionextrakt nachgewiesen werden. Da Kollagen Typ VII von Autoantikörpern in unserem Extrakt kultivierter Keratinozyten nicht erkannt wurde, versuchten wir den Kollagen Typ VII-Nachweis weiter zu optimieren. Als geeignete Substrate zeigten sich in unseren Untersuchungen das dermale Extrakt und der konzentrierte Überstand kultivierter Keratinozyten. Die Autoantikörper von beiden getesteten Patienten mit Epidermolysis bullosa acquisita erkannten in beiden Extrakten sowohl die 290 kDa (volle Länge von Kollagen Typ VII) als auch die 145 kDa (NC1-Domäne) schwere Proteinbande. Der konzentrierte Überstand kultivierter Keratinozyten scheint ebenfalls ein geeignetes Substrat zum Nachweis von Kollagen Typ VII darzustellen. Ob dieses Substrat in der Routine eingesetzt werden kann, sollte jedoch durch ein größeres Kollektiv von EBA-Patienten untersucht werden. In den Studien von Oyama et al (2003), Batteux et al (1997) und Lee (2000), die alle dermales Extrakt als Substrat einsetzten, wurden ebenfalls nur wenige EBA-Patienten (maximal 10 Patienten) untersucht. Somit ist das dermale Extrakt aktuell das am Besten untersuchte Substrat zum Nachweis von Kollagen Typ VII, jedoch halten wir den konzentrierten Überstand von kultivierten Keratinozyten für eine geeignete Alternative.

Da $\alpha_6\beta_4$-Integrin in Extrakten kultivierter Keratinozyten nur von einem monoklonalen Antikörper gegen β_4-Integrin, jedoch nicht von Patientenseren erkannt wurde, versuchten wir in einem weiteren Teil unserer Arbeit den Nachweis von Autoantikörper gegen β_4-Integrin zu optimieren. In einer früheren Arbeit von Engineer et al konnte gezeigt werden, dass Autoantikörper von Patienten mit Schleimhautpemphigoid ein 205 kDa schweres Protein in einem Lysat aus Rinder-Gingiva erkennen (Engineer et al, 2000). In unserem Versuch gelang der Nachweis von Autoantikörper gegen β_4-Integrin in extrazellulärer Matrix von kultivierten Keratinozyten. Drei der 12 getesteten Seren von Patienten mit Schleimhautpemphigoid erkannten das 205 kDa schwere Protein. Diese Patienten wiesen in der indirekten Immunfluoreszenz auch eine Bindung der Autoantikörper im Blasendach auf. Ob die extrazelluläre Matrix in der Routine ein geeignetes Substrat ist, muss noch an einem größeren Patientengut untersucht werden.

Da die Reaktivität der Seren von Patienten mit Anti-Laminin5-Schleimhautpemphigoid mit Extrakten kultivierter Keratinozyten nicht befriedigend ausgefallen war, versuchten wir den Nachweis von Autoantikörpern gegen Laminin 5 zu optimieren. Das bislang sensitivste Verfahren zum Nachweis und zur Charakterisierung von Autoantikörpern gegen Laminin 5 in Seren von Patienten mit Schleimhautpemphigoid war die Immunpräzipitation mit radioaktiv markierten Extrakten kultivierter Keratinozyten oder Medium kultivierter Keratinozyten (Domloge-Hultsch et al, 1992; Domloge-Hultsch et al, 1994, Lazarova et al, 2004). Dieses Verfahren ist jedoch technisch sehr aufwendig, teuer und benötigt radioaktives Material. Somit bleibt die Verfügbarkeit dieser Methode nur auf eine kleine Anzahl von Forschungslabors beschränkt. Mehrere Arbeitsgruppen versuchten in der Vergangenheit, Immunoblots zu entwickeln, um eine einfachere, kostengünstigere, ubiquitär anwendbare und gleichzeitig ebenso sensitive Methode zum Nachweis von Autoantikörpern gegen Laminin 5 zu etablieren. Als Extrakte dienten hierbei beispielsweise humane Keratinozyten (Hsu et al,

1997), die Ratten-Zelllinie 804G (Baker et al, 1996), die humane MCF-10A Zelllinie (Stahl et al, 1997) und die humane SCC-12 Zelllinie (Rousselle and Aumailley, 1994). Jedoch hat sich bisher noch kein Standardextrakt zum Nachweis von Autoantikörper gegen Laminin 5 mittels Immunoblot etabliert. In dieser Studie wurden 5 verschiedene Extrakte miteinander verglichen. Die Ergebnisse der Studie von Lazarova et al (2004) flossen in die Arbeit ein und zeigten, dass das am Besten geeignete Substrat zum Immunoblotnachweis von Autoantikörpern gegen Laminin 5 die extrazelluläre Matrix von kultivierten Keratinozyten (ECM) ist. Damit können Autoantikörper gegen die nicht-prozessierte und prozessierte α_3-Kette sowie die nicht-prozessierte β_3-Kette nachgewiesen werden. Das Extrakt kultivierter Keratinozyten scheint im Nachweis von IgG-Autoantikörper eine gute Alternative zu sein. Der Vorteil des Extrakts kultivierter Keratinozyten ist die einfachere Herstellung, und dass damit weitere Autoantigene der bullösen Autoimmundermatosen wie beispielsweise BP180 und BP230 nachgewiesen werden können (Lazarova et al, 2004). Jedoch war die Sensitivität in der Testung der IgG_4-Reaktivität, die in Seren von Patienten mit Schleimhautpemphigoid vorherrschend ist (Roger et al, 1997) im Vergleich zu ECM geringer. Acht von 10 Patienten mit Anti-Laminin5-Schleimhautpemphigoid zeigten mit der extrazellulären Matrix eine IgG_4-Reaktivität mit einer oder mehreren Ketten des Laminin 5. Baikan et al (2005) berichteten über einen Patienten, der ausschließlich eine IgG_3-Reaktitivät gegen die α_3-Kette des Laminin 5 aufwies. Deshalb testeten wir die beiden Patienten, die keine IgG_4-Reaktivität aufwiesen, mit den anderen IgG-Subklassen. Einer dieser Patienten wies ausschließlich eine IgG_1-Reaktitivät gegen die prozessierte α_3-Kette, der andere Patient ausschließlich eine IgG_3-Reaktitivät gegen die prozessierte α_3-Kette und gegen die nicht prozessierte β_3-Kette des Laminin 5. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, das aufgereinigtes Laminin 5 ebenfalls ein geeignetes Substrat zum Nachweis von Autoantikörpern gegen Laminin 5 ist (Hisamatsu et al, 2003). In unseren Experimenten erkannte ein Patient mit Schleimhautpemphigoid in aufgereinigtem Laminin 5 die prozessierte α_3-Kette und die nicht-prozessierte β_3-Kette. In der extrazellulären Matrix und dem Extrakt kultivierter Keratinozyten

wurde jedoch zusätzlich auch die nicht-prozessierte α_3-Kette erkannt. Der Nachteil aller Immunoblotverfahren ist, dass unter den denaturierenden Bedingungen des Immunoblots konformationelle Epitope zerstört werden, somit können manche Patientenseren als falsch negativ eingestuft werden. Mit der Immunpräzipitation können auch Autoantikörper gegen konformationelle Epitope erkannt werden. Kürzlich wurde ein ELISA mit aufgereinigtem Laminin 5 entwickelt (Bekou et al, 2005), der im Vergleich zum Immunoblot mit aufgereinigtem Laminin 5 sensitiver, dafür aber weniger spezifisch ist.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass das Extrakt kultivierter Keratinozyten den größten Teil der verschiedenen Antigene der bullösen Autoimmundermatosen exprimiert und somit ein effizientes Substrat für den Immunoblotnachweis darstellt. Im Kombination mit Klinik und Immunfluoreszenz kann der Immunoblotnachweis mit Extrakten kultivierter Keratinozyten zur Diagnose der verschiedenen bullösen Autoimmundermatosen beitragen. Obwohl auch der Nachweis von Autoantikörpern gegen Laminin 5 mit Extrakten kultivierter Keratinozyten möglich ist, ist die extrazelluläre Matrix von kultivierten Keratinozyten dafür besser geeignet. Mit extrazellulärer Matrix gelingt auch der Nachweis von Autoantikörpern gegen β_4-Integrin. Somit kann es zur Differenzierung der verschiedenen Autoantikörper bei Patienten mit Schleimhautpemphigoid dienen. Zur Standardisierung dieses Substrats sollten aber noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Weiterhin konnten wir in dieser Arbeit zeigen, das der konzentrierte Überstand von kultivierten Keratinozyten zum Nachweis von Autoantikörpern gegen Kollagen Typ VII eine gute Alternative zum dermalen Extrakt darstellt.

6. Zusammenfassung

Die bullösen Autoimmundermatosen sind organspezifische Autoimmunkrankheiten, die durch das Auftreten einer Autoimmunantwort gegen Strukturproteine der Haut gekennzeichnet sind. Diese Proteine sind wichtig für den Zell-Zell-Kontakt der Keratinozyten bzw. für die Adhäsion der Epidermis auf der Dermis. Die blasenbildenden Autoimmunkrankheiten werden nach den betroffenen Zielstrukturen eingeteilt. Man unterscheidet vier Hauptgruppen: die Pemphigus- und Phemphigoid-Erkrankungen, die Epidermolysis bullosa acquisita und die Dermatitis herpetiformis Duhring. Entscheidend für die Diagnosestellung von bullösen Autoimmundermatosen sind Klinik, Histologie sowie direkte und indirekte Immunfluoreszenzuntersuchung. Zur exakten Einordnung der verschiedenen bullösen Dermatosen ist die Charakterisierung der Autoantikörper durch immunserologische Tests notwendig. In der vorliegenden Arbeit beschäftigten wir uns mit der Optimierung des Immunoblotnachweises. Wir untersuchten die Seren von 120 Patienten mit bullösen Autoimmundermatosen mit Extrakten kultivierter Keratinozyten. 63 von 78 Patienten mit bullösem Pemphigoid erkannten entweder BP180 oder BP230. 16 von 18 Patienten mit Pemphigoid gestationis reagierten ebenfalls mit BP180 seltener auch mit BP230. Fünf von 6 Patienten mit Pemphigus vulgaris erkannten Desmoglein 3, einer davon zusätzlich Desmoglein 1. Zwei von 2 Patienten mit Pemphigus foliaceus reagierten mit Desmoglein 1. Fünf von 5 Patienten mit paraneoplastischem Pemphigus zeigten eine Reaktivität mit Envo-, Peri- oder Desmoplakin. Drei von 11 Patienten mit Schleimhautpemphigoid reagierten mit Laminin 5, ein Patient mit BP180. Autoantikörper gegen Kollagen Typ VII und β_4-Integrin konnten mit Extrakten kultivierter Keratinozyten nicht nachgewiesen werden. Deshalb versuchten wir in weiteren Experimenten, den Nachweis dieser beiden Antigene zu optimieren. Zwei von 2 Patienten mit Epidermolysis bullosa acquisita erkannten Kollagen Typ VII in dermalen Extrakten und konzentriertem Überstand von kultivierten Keratinozyten. Autoantikörper gegen β_4-Integrin konnten mit extrazellulärer

Matrix von kultivierten Keratinozyten in 3 von 12 Seren von Patienten mit Schleimhautpemphigoid nachgewiesen werden.

Da der Nachweis von Laminin 5 mit Extrakten kultivierter Keratinozyten nicht zufriedenstellend war, wurde auch dieser Immunoblotnachweis weiter optimiert. Wir konnten zeigen, dass die extrazelluläre Matrix kultivierter Keratinozyten ein besser geeignetes Substrat zum Nachweis von Antikörper gegen Laminin 5 ist, vor allem zum Nachweis der IgG-Subklassen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen insgesamt, dass das Extrakt kultivierter Keratinozyten den größten Teil der verschiedenen Antigene der bullösen Autoimmundermatosen enthält und somit ein effizientes Substrat für den Immunoblotnachweis darstellt. Der Nachweis von Autoantikörper gegen Laminin 5 ist zwar ebenfalls mit diesem Extrakt möglich, sensitiver ist jedoch der Nachweis unter Verwendung extrazellulärer Matrix. Mit extrazellulärer Matrix gelingt auch der Nachweis von Autoantikörpern gegen β_4-Integrin. Weiterhin konnten wir zeigen, dass der konzentrierte Überstand von kultivierten Keratinozyten zum Nachweis von Autoantikörpern gegen Kollagen Typ VII eine gute Alternative zum dermalen Extrakt darstellt.

7. Literatur

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

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

Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beads TF, Diaz LA: Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the diesease. *N Eng J Med*; 306:1189-1196, 1982

Anhalt GJ, Kim S, Stanley JR, Korman NJ, Jabs DA, Kory M, Izumi H, Ratrie H III, Mutasim D, Ariss-Abdo L, Labib RS.: Paraneoplastic pemphigus: an autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. *N Engl J Med*; 323:1729-1735, 1990

Baikan A, Hirako Y, Lazarova Z, Yancey KB, Zillikens D, Sitaru C: IgG autoantibodies to type VII collagen and an exclusive IgG3 reactivity to the laminin alpha3 chain in a patient with an autoimmune subepidermal blistering disease. *J Am Acad Dermatol;* 53:517-522, 2005

Baker SE, Hopkinson SB, Fitchmun M, Andreason GL, Frasier F, Plopper G, Quaranta V, Jones JC: Laminin 5 and hemidesmosomes: Role of the alpha 3 chain subunit in hemidesmosome stability and assembly. *J Cell Sci;* 109:2509-2520, 1996

Balding SD, Prost C, Diaz LA, Bernard P, Bedane C, Aberdam D, Giudice GJ: Cicatricial pemphigoid autoantibodies react with multiple sites on the BP180 extracellular domain. *J Invest Dermatol*; 106:141-146, 1996

Bastuji-Garin S, Souissi R, Blum L, Turki H, Nouira R, Jomaa B, Zahaf A, Osman AB, Mokhar I, Fazaa B, Revuz J, Roujeau JC, Kamoun MR: Comparative epidemiology of pemphigus in Tunesia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunesian women. *J Invest Dermatol*; 104:302-305, 1995

Batteux F, Franck N, Jaffray P, Raulo M, Prost C, Leibowitch M, Escande JP, Weill B: An extract from cultured human keratinocytes that contains the major autoantigens related to autoimmune bullous skin diseases. *Journal of Clinical Immunology*; Vol 17, No 3, 1997

Bekou V, Thoma-Uszynski S, Wendler O, Uter W, Schwietzke S, Hunziker T, Zouboulis CC, Schuler G, Sorokin L, Hertl M: Detection of Laminin 5-Specific autoantibodies in Mucous Membrane and Bullous Pemphigoid Sera by ELISA;*J Invest Dermatol;* 124:732-740, 2005

Bernard P, Vaillant L, Labeille B, Bedane C, Arbeille B, Denoeux JP, Lorette G, Bonnetblanc JM, Prost C: Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. *Arch Dermatol*; 131:48-52, 1995

Beutner EH, Jordon RE: Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescence staining. *Proc Soc* Exp *Biol Med*; 117:505-510, 1964

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

Bhol KC, Goss L, Kumari S, Colon JE, Ahmed AR: Autoantibodies to human alpha6 integrin in patients with oral pemphigoid. *J Dent Res*; 80:1711-1715, 2001

Borradori L, Sonnenberg A: Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol*; 112:411-418, 1999

Burgeson RE, Christiano AM: The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol*; 9:651-658, 1997

Buxton RS, Cowin P, Franke WW, Garrod DR, Green KJ, King IA, Koch PJ, Magee AI, Rees DA, Stanley JR, Steinberg MS: Nomenclature of the desmosomal cadherins. *J Cell Biol;* 121:481-483, 1993

Campo-Voegeli A, Muniz F, Mascaro JM, Garcia F, Casals A, Arimany JL, Amagai M, Camps A: Neonatal pemphigus vulgaris with extensive mucocutaneous lesions from a mother with oral pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol*; 147:801-805, 2002

Chan LS, Majmudar AA, Tran HH, Meier F, Schaumburg-Lever G, Chen M, Anhalt G, Woodley DT, Marinkovich MP: Laminin-6 and Laminin-5 are recognized by autoantibodies in a subset of cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol*; 108:848-853, 1997

Chan RY, Bhol K, Tesavibul N, Letko E, Simmons RK, Foster CS, Ahmed AR: The role of antibody to human beta4 integrin in conjunctival basement membrane separation: Possible in vitro model for ocular cicatricial pemphigoid. *Invest Ophthalmol Vis Sci ;* 40 :2283-2290, 1999

Chen M, Chan LS, Cai X, O´Toole EA, Sample JC, Woodley DT: Development of an ELISA for rapid detection of anti-type VII collagen autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol*; 108:68-72, 1997

Chen M, Marinkovich MP, Jones JC, O´Toole EA, Li YY, Woodley DT: NC1 domain of type VII collagen binds to the beta3 chain of laminin 5 via a unique subdomain within the fibronectin-like repeats. *J Invest Dermatol;* 112:177-183,1999

Chimanovitch I, Schmidt E, Messer G, Dopp R, Partscht K, Brocker EB, Giudice GJ, Zillikens D: IgG1 and IgG3 are the major immunoglobulin subclasses targeting epitopes within the NC16A domain of BP180 in pemphigoid gestationes. *J Invest Dermatol*; 113:140-142, 1999

Diaz LA, Sampaio SAP, Rivitti EA, Martins CR, Cunha PR, Lombardi C, Almeida FA, Castro RM, Macca ML, Lavrado C, Filho GH, Borges P, Chaul A, Minelli L, Empinotti JC, Friedmann H, Campbell I, Labib RS, Anhalt GJ: Endemic pemphigus foliaceus (Fogo selvagem): II: Current and historic epidemiologic studies. *J Invest Dermatol*; 92:4-12, 1989

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

Domloge-Hultsch N, Gammon WR, Briggaman RA, Gil SG, Carter WG, Yancey KB: Epiligrin, the major human keratinocyte integrin ligand, is a target in both an acquired autoimmune and an inherited subepidermal blistering skin disease. *J Clin Invest*; 90:1628-1633, 1992

Domloge-Hultsch N, Anhalt GJ, Gammon WR, Lazarova Z, Briggaman R, Welch M, Jabs DA, Huff C, Yancey KB: Anti-epiligrin cicatricial pemphigoid. a subepithelial bullous disorder. *Arch Dermatol;* 130:1521-1529, 1994

Döpp R, Schmidt E, Chimanovitch I, Leverkus M, Bröcker EB, Zillikens D: IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in bullous pemphigoid: Serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *J Am Acad Dermatol;* 42:577-583, 2000

Emery DJ, Diaz LA, Fairly JA, Lopez A, Taylor AF, Giudice GJ: Pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris autoantibodies react with the extracellular domain of desmoglein 1. *J Invest Dermatol*; 104:323-328, 1995

Engineer L, Johnson RE, Bhol KC, Ahmed AR: Bovine gingival lysate: a novel substrate for rapide diagnosis of autoimmune vesiculobullous diseases. *Exp Dermatol;* 9:271-274, 2000

Eyre RW, Stanley JR: Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemhigus foliaceus antigen. *J Clin Invest*; 81:807-812, 1988

Fitzpatrick RE, Newcomer VD: The correlation of disease activity and antibody titers in pemphigus. *Arch Dermatol*; 116:285-290, 1980

Gammon WR, Merrit CC, Lewis DM, Sams Jr WM, Carlo JR, Wheeler Jr CE: An in vitro model of immune complex-mediated basement membrane zone separation caused by pemphigoid antibodies, leukocytes, and complement. *J Invest Dermatol*; 78:285-290, 1982

Gammon WR, Briggaman RA, Inman AO III, Queen LL, Wheeler CE: Differentiating anti-lamina lucida and anti-sublamina densa anti-BMZ antibodies by indirect immunofluorescence on 1.0 M sodium chloride-separated skin. *J Invest Dermatol*; 82:139-144, 1984

Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA: Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J Invest Dermatol*; 99:243-250, 1992

Giudice GJ, Emery DJ, Zelickson BD, Anhalt GJ, Liu Z, Diaz LA: Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Immun*; 151:5742-5750, 1993

Hall III RP, Murray JC, McCord MM, Rico MJ, Streilein RD: Rabbits immunized with a peptide encoded for by the 230-kD bullous pemphigoid antigen cDNA develop an inflammatory response to UVB irridiation: a potential animal model for bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol*; 101:9-14, 1993

Hashimoto T, Ogawa MM, Konohana A, Nishikawa T: Detection of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antigens by immunoblot analysis using different antigen sources. *J Invest Dermatol*; 94:327-331, 1990

Hirako Y, Usukura F, Uematsu F, Hashimoto T, Kitajima Y, Owariba K: Cleavage of BP180, a 180-kDa bullous pemphigoid antigen, yields a 120-kDa collagenous extracellular polypeptide. *J Biol Chem;* 273:9711-9717, 1998

Hirsch R, Anderson J, Weinberg JM, Burnstein R, Echt A, Fermin J, Heilman ER, Laude TA: Neonatal pemphigus foliaceus. *Am Acad Dermatol*; 49:S187-189, 2003

Hisamatsu Y, Nishiyama T, Amano S, Matsui C, Ghohestani R, Hashimoto T: Usefulness of immunoblotting using purified laminin 5 in the diagnosis of anti-laminin 5 cicatricial pemphigoid. *J Dermatol Sci*; 33:113-119,2003

Holmes RC, Black MM, Dann J, James DC, Bhogal B: A comparative study of toxic erythema of pregnancy and herpes gestationis. *Br J Dermatol*; 106: 499-510, 1982

Hsu R, Lazarova Z, Yee C, Yancey KB: Noncomplement fixing, IgG4 autoantibodies predominate in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermal;* 109:557-561, 1997

Ishii K, Amagai M, Hall RP, Hashimoto T, Takayanagi A, Gamou S, Shimizu N, Nishikawa T: Characterisation of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *J Immunol;* 159:2010-2017, 1997

Jordon RE, Heine KG, Tappeiner G, Bushkell LL, Provost TT: The immunopathology of herpes gestationis. Immunofluorescence studies and characterization of “HG-factor”. *J Clin Invest*; 57:1426-1431, 1976

Jung M, Kippes W, Messer G, Rzany B, Zillikens D: Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence. *J Am Acad Dermatol*; 41:266-268, 1999

Katz SI, Hertz KC, Yaoita H: Immunopathology and characterization of the HG factor. *J Clin Inves;* 57:1434-1441, 1976

Kelly SE, Wojnarowska F: 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, 1988

Kim SC, Kwon YD, Lee IJ, Chang SN, Lee TG: cDNA cloning of the 210-kDa paraneoplastic pemphigus antigen reveals that envoplakin is a componenent of the antigen complex. *J Invest Dermatol*; 109:365-369, 1997

Kippes W, Schmidt E, Roth A, Rzany B, Bröcker EB, Zillikens D: Immunopathologische Veränderungen bei 115 Patienten mit bullösem Pemphigoid. *Hautarzt*; 50:866-872, 1999

Kirtschig G, Marinkovich MP, Burgeson RE, Yancey KB: Anti-basement membrane autoantibodies in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid bind the alpha subunit of laminin 5. *J Invest Dermatol*; 105:543-548, 1995

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

Kowalczyk AP, Bornslaeger EA, Norvell SM, Palka HL, Green KJ: Desmosomes:intercellular adhesive junction specialized for attachement of intermediate filaments. *Int Rev Cytol.*; 185:237-302, 1999

Kunte C, Barbosa JM, Wolff H, Meurer M: Brasilianischer Pemphigus foliaceus (Fogo selvagem). *Hautarzt*; 48:228-233, 1997

Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, Mutasim DF, Diaz LA: Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. *J Immunol*; 136:1231-1235, 1986

Lapiere JC, Woodley DT, Parente MG, Iwasaki T, Wynn KC, Christiano AM, Uitto J: Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognizes by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. *J Clin Invest;* 92:1831-1839, 1993

Lawley TJ, Stingl G, Katz SI: Fetal and maternal risk factor in herpes gestationis. *Arch Dermatol*; 114:552-555, 1978

Lazarova Z, Yee C, Darling T, Briggaman RA, Yancey KB: Passive transfer of anti-laminin 5 antibodies induces subepidermal blisters in neonatal mice. *J Clin Invest*; 98:1509-1518, 1996

Lazarova Z, Hsu r, Yee C, Yancey KB: Antiepiligrin cicatricial pemphigoid represents an autoimmune response to subunits present in laminin 5 ($\alpha_3\beta_3\gamma_2$). *Br J Dermatol*; 139:791-797, 1998

Lazarova Z, Sitaru C, Zillikens D, Yancey KB: Comparative analysis of methods for detection of anti-laminin 5 autoantibodies in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid. *J Am Acad Dermatol;* 51:886-892, 2004

Lee CW: An extract of cultured A431 cells contains major tissue antigens of autoimmune bullous diseases. *Br J Dermatol;* 143:821-823, 2000

Leverkus M, Bhol K, Hirako Y, Pas H, Sitaru C, Baier G, Brocker EB, Jonkman MF, Ahmed AR, Zillikens D: Cicatricial pemphigoid with circulating autoantibodies to β4 integrin, bullous pemphigoid 180 and bullous pemphigoid 230. *Br J Dermatol*; 145:998-1004, 2001

Liu Z, Diaz LA, Swartz SJ, Troy JL, Fairley JA, Giudice GJ: Molecular mapping of a pathogenically relevant BP180 epitope associated with experimentally induced murine bullous pemphigoid. *J Immunol*; 155:5449-5454, 1995

Luke MC, Darling TN, Hsu R, Summers RM, Smith JA, Solomon BI, Thomas GR, Yancey KB: Mucosal morbidity in patients with epidermolysis bullosa acquisita. *Arch Dermatol*; 135:954-959, 1999

Mahoney MG, Aho S, Uitto J, Stanley JR: The members of the plakin family of proteins recognized by paraneoplastic pemphigus antibodies include periplakin. *J Invest Dermatol*; 111:308-313, 1998

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

Morrison LH, Labib RS, Zone JJ, Anhalt GJ: Herpes gestationis antibodies recognize a 180-kD human epidermal antigen. *J Clin Invest*; 81:2023-2026, 1988

Murakami H, Nishioka S, Setterfield J, Bhogal BS, Black MM, Zillikens D, Yancey KB, Balding SD, Giudice GJ, Diaz LA; Nishikawa T, Kiyokawa C, Hashimoto T: Analysis of antigens targeted by circulating IgG and IgA autoantibodies in 50 patients with cicatricial pemphigoid. *J Dermatol Sci*; 17:39-44, 1998

Naito K, Morioka S, Ogawa H: The pathogenic mechanisms of blister formation in bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol*; 79:303-306, 1982

Ogilvie P, Trautmann A, Dummer W, Rose C, Bröcker EB, Zillikens D: Pemphigoid gestationis ohne Blasenbildung. *Hautarzt*; 51:25-30, 2000

Ohata Y, Hashimoto T, Nishikawa T: Comparative study of autoantigens for various bullous skin diseases by immunoblotting using different dermo-epidermal separation techniques. *Clinical and Experimental Dermatology;* 20:454-458, 1995

Oyama N, Bhogal BS, Carrington P, Gratian MJ, Black MM: Human placental amnion is a novel substrate for detecting autoantibodies in autoimmune bullous diseases by immunoblotting. *Br J Dermatol;* 148:939-944, 2003

Pas H: Immunoblot assay in differential diagnosis of autoimmune blistering skin diseases *Clinics in Dermatology; 19, 2001*

Roenigk HH, Ryan JG, Bergfeld WF: Epidermolysis bullosa acquisita: report of three cases and review of all published cases. *Arch Dermatol*; 103:1-10, 1971

Rousselle P, Aumailley M: Kalinin is more efficient than laminin in promoting adhesion of primary keratinocytes and some other epithelial cells and has a different requirement for integrin receptors. *J Cell Biol;* 125:205-214, 1994

Sabolinski ML, Beutner EH, Krasny S, Kumar V, Huang J, Chorzelski TP, Sampaio S, Bystryn JC: Substrate specificity of anti-epithelial antibodies of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera in immunofluorescence tests on monkey and guinea pig esophagus sections. *J Invest Dermatol*; 88:545-549, 1987

Schmidt E, Obe K, Bröcker EB, Zillikens D:Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol*; 136:174-178, 2000

Setterfield J, Shirlaw PJ, Kerr-Muir M, Neill S, Bhogal BS, Morgan P, Tilling K, Challacombe SJ, Black MM: Mucous membrane pemphigoid: a dual circulating antibody response with IgG and IgA signifies a more severe and persistent disease. *Br J Dermatol*; 138:602-610, 1998

Setterfield J, Shirlaw PJ, Bhogal BS, Tilling K, Challacombe SJ, Black MM: Cicatricial pemphigoid: Serial titres of circulating IgG and IgA antibasement membrane antibodies correlate with disease activity. *Br J Dermatol;* 140:645-650, 1999

Shimizu H, Nishikawa T, Hashimoto T, Kikuchi A, Ishiko A, Masunaga T: Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera show an inversely graded binding pattern to extracellular regions of desmosomes in different layers of human epidermis. *J Invest Dermatol*; 105:153-159, 1995

Shimanovich I, Hiraku Y, Sitaru C, Hashimoto T, Brocker EB, Butt E, Zillikens D: The autoantigen of anti-p200 pemphigoid is an acidic noncollagenous N-linked glycoprotein of the cutaneous basement membrane. *J Invest Dermatol;* 121:1402-1408, 2003

Shornick JK: Herpes gestationis. *J Am Acad Dermatol*; 17:539-556, 1987

Sitaru C, Goebeler M, Zillikens D: Bullous autoimmune dermatoses (I): Pathogenesis and diagnosis. *J Dtsch Dermatol Ges*; 2:123-128, 2004

Sitaru C, Powell J, Messer G, Brocker EB, Wojnarowska F, Zillikens D: Immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of pemphigoid gestationis. *Obstet Gynecol;* 103:757-763, 2004

Sitaru C, Zillikens D: Mechanisms of blister induction by autoantibodies. *Exp Dermatol;* 14:861-875, 2005

Smoller BR, Woodley DT: Differences in direct immunofluorescence staining patterns in epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol*; 27:674-678, 1992

Stahl S, Weitzmann S, Jones JC: The role of laminin 5 and its receptors in mammary epithelial cell branching morphogenesis. *J Cell Sci;* 110:55-63, 1997

Stanley JR, Hawley-Nelson P, Yuspa SH, Shevach EM, Katz SI: Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified epithelia. *Cell*; 24:897-903, 1981

Stanley JR, Amagai M: Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. *N Engl J Med*; 355:1800-1810, 2006

Tyagi S, Bhol K, Natarajan K, Livir-Rallatos C, Foster CS, Ahmed AR: Ocular cicatricial pemphigoid antigen: partial sequence and biochemical characterization. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:14714-14719, 1996

Wever S, Rank C, Hornschuh B, Hashimoto T, Nishikawa T, Bröcker EB, Zillikens D: Bullöses Pemphigoid unter dem Bild einer Prurigo simplex subacuta. *Hautarzt*; 46:789-795, 1995a

Wever S, Burger M, Langfritz K, Hashimoto T, Nishikawa T, Bröcker EB, Zillikens D: Herpes gestationis. Klinisches Spektrum und diagnostische Möglichkeiten. *Hautarzt*; 46:158-164, 1995b

Woodley DT, Briggaman RA, O´Keefe EJ, Inman AO, Queen LL, Gammon WR: Identification of the skin basemant-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. *N Engl J Med*; 310:1007-1013, 1984

Woodley DT, Burgeson RE, Lunstrum G, Bruckner-Tuderman L, Reese MJ, Briggaman RA: Epidermolysis bullosa acquisita antigen is the globular carboxyl terminus terminus of type VII procollagen. *J Clin Invest;* 81:683-687, 1988

Yancey KB: Adhesion molecules. II: Interactions of keratinocytes with epidermal basement membrane. *J Invest Dermatol*; 104:1008-1014, 1995

Zambruno G, Manca V, Kanitakis J, Cozzani E, Nicolas JF, Giannetti A: Linear IgA bullous dermatosis with IgA autoantibodies to a 290 kd antigen of anchoring fibrils. *J Am Acad Dermatol*; 31:884-888, 1994

Zillikens D, Bröcker EB: Paraneoplastischer Pemphigus. *Hautarzt*; 45:827-833, 1994

Zillikens D, Erhard H, Prost C, Hashimoto T, Nishikawa T, Bröcker EB: Inflammatorischer Typ der Epidermolysis bullosa acquisita. *Hautarzt*; 45:166-170, 1994

Zillikens D, Wever S, Roth A, Hashimoto T, Bröcker EB: Incidence of autoimmune subepidermal blistering dermatoses in a region of central Germany. *Arch Dermatol*; 131:957-958, 1995a

Zillikens D, Giudice GJ, Diaz LA: Bullous pemphigoid: An autoimmune blistering disease of the elderly. *J Geriatr Dermatol*; 4:35-41, 1995b

Zillikens D, Kawahara Y, Ishiko A, Shimizu H, Mayer J, Rank CV, Liu Z, Giudice GJ, Tran HH, Marinkovich MP, Brocker EB, Hashimoto T: A novel subepidermal blistering disease with autoantibodies to a 200-kDa antigen of the basement membrane zone. *J Invest Dermatol;* 106:1333-1338, 1996

Zillikens D, Rose PA, Balding SD, Liu Z, Olague-Marchan M, Diaz LA, Giudice GJ: Thigt clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. *J Invest Dermatol*; 109:573-579, 1997

Zillikens D, Giudice GJ: BP180/type XVII collagen: Its role in acquired and inherited disorders of the dermal-epidermal junction. *Arch Dermatol Res*; 291:187-194, 1999

Zillikens D: Acquired skin disease of hemidesmosomes. *J Dermatol Sci*; 20:134-154, 1999

Zillikens D: Bullöse Autoimmundermatosen. In: Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf W, Landthaler M (Hrsg.). Dermatologie, 5. Auflage. Springer, Heidelberg Berlin 2005, pp 607-638

Danksagung

Ich möchte mich bei Professor Detlef Zillikens für die Durchführung der Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe und für die Bereitstellung der Mittel bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Professor Bröcker für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in ihrem Institut durchführen zu können.

Für die geduldige und ausführliche Erklärung jedweder Frage, die Unterstützung und Hilfe in Labor- und Auswertungsfragen, das Verbessern der ewig gleichen Fehler und das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich von ganzem Herzen bei Herrn Dr. Cassian Sitaru.

Für die freundliche Bereitstellung der polyklonalen Antikörper gegen Desmocollin 1 und Laminin 5 danke ich Professor David R. Garrod, Manchester und Dr. Kim B. Yancey, Milwaukee, Wisconsin.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre geduldige und liebevolle Unterstützung. Danke, dass ihr immer für mich da seid.

Last, but not least…Danke an meine Schwester Sabine, meinen Bruder Jürgen und meine Freunde für ihre Unterstützung und Motivationshilfe.