

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

**Charakterisierung der zirkulierenden Autoantikörper  
mit Hilfe nativer und rekombinanter Formen von BP180,  
Kollagen Typ VII und Laminin 5  
bei Patienten mit Schleimhautpemphigoid**

**Inaugural- Dissertation**  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Christian Skrobek  
aus Würzburg

Würzburg, April 2007

Referent: Prof. Dr. med. Detlef Zillikens  
Koreferentin: Prof. Dr. med. Eva- B. Bröcker  
Dekan: Prof. Dr. med. Mathias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.9.2007

Der Promovend ist Arzt.

meinen Eltern  
in Liebe und Dankbarkeit  
gewidmet



## **Inhaltsverzeichnis**

1 Einleitung	1
2 Fragestellung	6
3 Material und Methoden	7
3.1 Patienten und Seren	7
3.2 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	9
3.3 Proteinherstellung	9
3.3.1 Rekombinante Proteine	9
3.3.1.1 Expression der GST- BP180 Fusionsproteine	9
3.3.1.2 Affinitätsaufreinigung der GST- Fusionsproteine	12
3.3.2 Native Proteine und Extrakte	12
3.3.2.1 Dermales Extrakt	12
3.3.2.2 Keratinozyten-Extrakt	13
3.3.2.3 HaCaT-Überstand	13
3.4 Westernblot-Untersuchungen	14
3.5 Immunadsorptionen	16
3.6 Immunpräzipitation mit Laminin 5	16
4 Ergebnisse	17
5 Diskussion	23
6 Zusammenfassung	30
7 Literaturverzeichnis	32
8 Anhang	42
<u>8.1</u> Verzeichnis wichtiger Abkürzungen	42
<u>8.2</u> Danksagung	44
<u>8.3</u> Lebenslauf	45

## 1 Einleitung

Das Schleimhautpemphigoid (SHP) (im englischen mucous membrane pemphigoid, [MMP]) ist eine chronische, subepidermal blasenbildende Autoimmundermatose, die hauptsächlich die Schleimhäute betrifft. Außerhalb der Mundhöhle heilen die Blasen charakteristischerweise unter Ausbildung von Narben ab, weshalb bis vor kurzem die Bezeichnung *vernarbendes Pemphigoid* gewählt wurde (Chan et al, 2002).

Schon 1794 beschrieben Wichmann et al den ersten Fall eines okulären vernarbenden Pemphigoid (Wichmann, 1794). Auf Grund mangelnder diagnostischer Methoden wurde diese Erkrankung lange zu anderen blasenbildenden Krankheiten gezählt. Erst 1943 trennten Civatte und 1951 Lever et al das Schleimhautpemphigoid vom Pemphigus vulgaris auf Grund histopathologischer Untersuchungen (Civatte et al, 1943; Civatte et al, 1949; Lever 1951).

### *Klinik*

Das SHP betrifft vor allem die Konjunktiven sowie die Schleimhäute von Mundhöhle, Nase, Ösophagus und Genitale; bei 30% der Patienten ist auch das verhornende Integument befallen. Bei manchen Patienten bildet sich nur eine einzelne Läsion, andere zeigen ein generalisiertes progressives Erscheinungsbild mit dem chronischen Befall unterschiedlicher Schleimhäute. Charakteristischerweise verheilen die Läsionen außerhalb der Mundhöhle unter Ausbildung von Narben (Übersicht in Yancey, 2003; Mutasim, 2004). Der Begriff des benignen SHP, der in weiten Teilen des 20. Jahrhunderts verwendet wurde, ist irreführend, da die Narbenbildung z.B. am Auge zur Erblindung führen kann, in der Speiseröhre zur Störung der Nahrungsaufnahme bis hin zur Kachexie und durch Narben in der Trachea zu vital bedrohlichen Atemproblemen. Gegen Ende des letzten Jahrhunderts setzte sich deshalb der Begriff *vernarbendes Pemphigoid* durch. Im Laufe der Zeit wurden einige andere blasenbildende Autoimmundermatosen mit einem ähnlichen klinischen (Befall der Schleimhäute) und immunhistochemischen Erscheinungsbild (Immunglobulin-Ablagerung entlang der Basalmembranzone) unterschieden, die sich hauptsächlich in ihrer Pathogenese (d.h. unterschiedliche Autoantikörper und -antigene) von einander abgrenzten.

In einer Consensus-Arbeit (Chan et al, 2002) wurden alle chronischen, subepidermal blasenbildenden Autoimmundermatosen mit überwiegendem Befall der Schleimhäute zum SHP zusammengefasst, bei denen IgG, IgA oder C3 entlang der Basalmembran in der direkten immunfluoreszensoptischen Untersuchung gefunden wird. Das SHP schließt daher auch die Epidermolysis bullosa acquisita und die Lineare IgA Dermatose ein, wenn überwiegender Schleimhautbefall vorliegt.

### *Epidemiologie*

Das SHP betrifft häufiger Frauen als Männer (2,27:1) (Ahmed et al, 1991). Die Inzidenz beträgt in Deutschland 0,87 Neuerkrankungen pro eine Millionen Einwohner, in Frankreich 1,16 pro eine Millionen Einwohner (Zillikens et al, 1995; Bernard et al, 1995). Es wird über eine Assoziation mit HLA-DR4 und HLA-DQw7 für das okuläre und mit HLA-DQB1\*0301 für das orale und okuläre SHP berichtet (Übersicht in Yancey, 2003; Mutasim, 2004). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt in der Mitte des 6. Lebensjahrzehnts (Lascaris et al, 1982), es wurden aber auch Fälle von SHP bei Kindern beschrieben (Rosenbaum et al, 1984).

### *Histologie und Immunfluoreszenz*

Mikroskopisch findet man eine subepidermale Spaltbildung mit einem gemischten perivaskulären Entzündungsinfiltrat in der Dermis. Akantholyse ist nicht vorhanden (Übersicht in Ahmed et al, 1991). Die Spaltbildung erfolgt dabei in der Lamina lucida oder am Übergang zur Lamina densa (Bedane et al, 1997; Shimizu et al, 1995; Bernard et al, 1990; Bedane et al, 1991).

In der direkten Immunfluoreszenz (DIF) einer periläsionaler Biopsie werden gewebsgebundene Autoantikörper oder Komplement an der Basalmembranzzone nachgewiesen. Typischerweise erkennt man lineare Ablagerungen von Komplementfaktor C3, IgG oder IgA, oder eine Kombination daraus. (Übersicht in Ahmed et al, 1991)

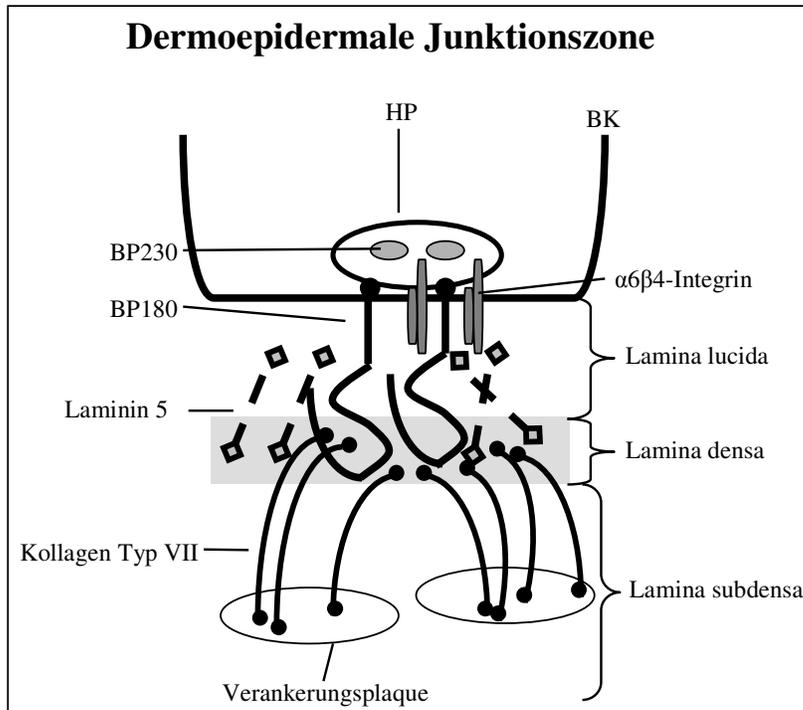
In der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) auf humaner Spalthaut lassen sich zirkulierende Autoantikörper gegen Strukturen der dermo-epidermalen Junktionszone (DEJ) im Serum der Erkrankten nur in etwa der Hälfte der Fälle nachweisen (Yancey, 2003; Kelly et al, 1988; Balding et al, 1996; Murakami et al, 1998). Auch hier wird die Heterogenität der Erkrankung offenbar. Die Autoantikörper binden zum einen im Dach der artifiziellen

Blase, dies weist auf BP180, BP230 oder  $\alpha 6\beta 4$ -Integrin als Zielantigene hin. Zum anderen werden aber auch lineare IgG-Ablagerungen am Blasenboden gefunden, was durch Antikörper gegen Laminin 5, Laminin 6 oder Typ VII Kollagen erklärt werden kann. Einige Patientenserum reagieren mit beiden obengenannten Lokalisationen (Yancey, 2003).

#### *Autoantikörper und Antigene*

Dantzig (1973) konnte als Erster IgG-Autoantikörper im Serum eines Patienten mit SHP nachweisen. Verschiedene Strukturproteine der DEJ wurden als spezifische Autoantikörperziele beschrieben. Am häufigsten werden dabei Autoantikörper gegen das 180 kD schwere bullöse Pemphigoid Antigen 2 (BP180), auch Typ XVII-Kollagen genannt, nachgewiesen (Bernard et al, 1990 und 1992; Nie et al, 1999; Murakami et al, 1998; Balding et al, 1996). Zusätzlich wurde Reaktivität mit BP230 gefunden (Balding et al, 1996, Murakmai et al, 1998). Aber auch Patienten mit einer Reaktivität gegen Laminin 5 bilden eine substantielle Gruppe von ca. 20 % der SHP-Patienten (Leverkus et al, 1999; Domloge-Hultsch et al, 1992 und 1994). Desweiteren wurden Antikörper gegen Laminin 6 (Chan et al, 1997; Leverkus et al. 1999) und  $\beta 4$ - Integrin (Tyagi et al, 1996) gefunden. Gegen das Lineare IgA Dermatose-Antigen 1 (LAD-1), ursprünglich als Autoantigen der linearen IgA- Dermatose beschrieben, wurden ebenfalls Antikörper im Serum von SHP-Patienten gefunden (Roh et al, 2000; Schumann et al, 2000). Später wurde jedoch klar, wie unten angeführt, daß LAD-1 dem abgespaltenen extrazellulären Anteil von BP180 entspricht. Ebenfalls wurden Antikörper gegen  $\alpha 6$ -Integrin bei Patienten mit oralem SHP nachgewiesen (Bhol et al, 2001).

Die genannten Proteine sind alle Bestandteile der DEJ, welche die Epidermis mit der Dermis verbindet. Durch Interaktionen untereinander und mit anderen Strukturproteinen bilden sie ein Netzwerk, das einen wichtigen Beitrag zur mechanischen Belastbarkeit der Haut leistet. Die Bedeutung dieser Strukturproteine für die Integrität der DEJ wird zudem durch die hereditären bullösen Epidermolysen verdeutlicht. Durch die Mutation der Gene, die für diese Proteine kodieren, kommt es ebenfalls zur Blasenbildung (Schmidt et Zillikens, 2000).



**Abbildung 1 Schematische Darstellung der dermoepidermalen Junktionszone (DEJ)**

Unterhalb der basalen Keratinozyten (BK) lässt sich elektronenmikroskopisch die Lamina lucida, gefolgt von der Lamina densa und der Lamina subdensa darstellen. Als Bestandteil des hemidesmosomalen Plaques (HP) trägt BP230 zur Verankerung des Zytoskeletts am desmosomalen Plaques des basalen Keratinozyten bei. Vom HP gehen BP180 und  $\alpha 6\beta 4$  aus und verlaufen transmembranös in die Lamina lucida und Lamina densa hinein. Dabei interagieren sie untereinander und mit Laminin 5 und stehen dadurch und auch direkt mit Kollagen Typ VII in Verbindung. Dieses festigt als Ankerfibrille die Adhäsion der Lamina densa an der Verankerungsplaque der Lamina subdensa. Es wurden lediglich die in dieser Arbeit erwähnten Zielantigene berücksichtigt.

BP180, auch als Kollagen Typ XVII klassifiziert, ist ursprünglich als Zielantigen des bullösen Pemphigoids (BP) beschrieben worden (Labib et al, 1986). Inzwischen wurde aber auch bei anderen Dermatosen aus der Pemphigoidgruppe Autoantikörper gegen dieses Protein gefunden. Neben SHP sind dies Lichen planus pemphigoides (LPP) (Davis et al, 1991; Tamada et al, 1995), die lineare IgA Dermatose (LAD) (Ghohestani et al, 1997) sowie das Pemphigoid gestationis (PG) (Morrison et al, 1988).

BP180 ist ein 180 kDa schweres transmembranöses Glykoprotein der basalen Keratinozyten. Es liegt als Homotrimer vor und hat eine Typ II Orientierung, d.h. der Amino- (N)-Terminus liegt zytoplasmatisch, der Carboxy- (C)-Terminus ragt extrazellulär

bis in die Lamina densa der DEJ, bevor es in die Lamina lucida zurück knickt (Nonaka et al, 2000). Die Ektodomäne besteht aus 15 Kollagendomänen, die durch 16 nicht-kollagene Abschnitte unterbrochen werden. Typischerweise sind die Kollagendomänen in jeder dritten Position mit Glycin besetzt und haben einen hohen Prolin-Anteil (Giudice et al, 1992). Innerhalb der 16. nicht-kollagenen Domäne (NC16A), die unmittelbar an die Transmembranregion anschließt, wurde eine immundominante Region identifiziert. Sie ist Ziel von Autoantikörpern bei Patienten mit BP, LAD, LPP und PG (Giudice et al, 1993; Zillikens et al, 1997a, 1999a und 1999b). In einem Tiermodell zeigten Liu et al 1993 die pathogenetische Relevanz von Kaninchen-Antikörpern gegen murines BP180 für die Entstehung von subepidermalen Blasen in neonatalen Mäusen. Die Blasenbildung ist aber u.a. auch von der Komplement- und Neutrophilen-Aktivierung abhängig (Liu et al, 1995 und 1997). Hinweise für die pathogenetische Bedeutung von Antikörpern gegen BP180 beim humanen BP gelangen an Kulturen humaner Keratinozyten und Kryostatschnitten humaner Haut. Nach Inkubation mit anti-BP180 NC16A-Antikörpern zeigten sich die erhöhte Freisetzung und Expression von IL-6 und IL-8 aus kultivierten Keratinozyten bzw. eine subepidermale Spaltbildung der Kryostatschnitte (Schmidt et al, 2000; Sitaru et al, 2002).

## **2 Fragestellung**

Ziel dieser Arbeit war es, die Autoantikörper gegen Strukturen der DEJ im Serum von Patienten mit SHP näher zu charakterisieren, um Unterschiede zu bzw. Gemeinsamkeiten mit der Autoantikörper-Reaktivität anderer subepidermal blasenbildender Autoimmundermatosen zu erkennen. Außerdem gibt es mit den gängigen Methoden der Immunfluoreszenz gerade beim SHP häufig Schwierigkeiten, Autoantikörper im Serum der Patienten nachzuweisen. In der IIF auf humaner Spalthaut lassen sich zirkulierende Autoantikörper gegen Strukturen der DEJ im Serum der Erkrankten nur in etwa der Hälfte der Fälle detektieren (Yancey, 2003; Kelly et al, 1988; Balding et al, 1996; Murakami et al, 1998). Gerade bei SHP ist die Gewinnung von periläsionalen Biopsien zur DIF z.B. am Auge deutlich erschwert. Deshalb war es auch Ziel dieser Arbeit, neue Nachweismethoden miteinander zu vergleichen, um die Detektion zirkulierender Autoantikörper gegen BP180 und Laminin 5 in der Routinediagnostik zu verbessern.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Patienten und Seren

In dieser Arbeit wurden Seren von 26 Patienten mit SHP hinsichtlich ihrer Autoantikörperreaktivität gegen native und rekombinante Formen von BP180, Laminin 5 und gegen Kollagen Typ VII untersucht. Bei allen Patienten waren überwiegend die Schleimhäute betroffen (**Tabelle 1**); besonders an den Augen zeigte sich häufig eine Vernarbung der Läsionen. Daneben kam es in 38% der Fälle auch zu Beteiligung der normalen Haut. Bis auf zwei Ausnahmen, zeigten alle Patienten in der direkten Immunfluoreszenz-Mikroskopie periläsionaler Haut/Schleimhaut lineare Ablagerungen von C3, IgG und/oder IgA an der dermo-epidermalen Junctionszone (**Tabelle 1**). Die beiden in der DIF negativen Patienten wiesen zirkulierende Autoantikörper gegen BP180 auf (**Tabelle 4**) und konnten somit als SHP identifiziert werden.

Acht Patienten waren männlich, 18 weiblich. Der Altersdurchschnitt der Patienten war 76,6 Jahre, wobei das Alter von 59 bis 90 Jahren reichte. Die Blutproben wurden vor Therapiebeginn entnommen, bei 3000 U/min zentrifugiert und das Serum bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Als Negativkontrollgruppe dienten 20 Seren von Patienten unserer Allergieabteilung. Außerdem wurden vorcharakterisierte Seren von BP- und LAD- Patienten als Positivkontrollen im Immunoblot mit verschiedenen rekombinanten Fragmenten von BP180 verwendet (Kromminga et al, 2000; Georgi et al, 2001).

Zum Nachweis der für den Immunoblot verwendeten Proteine wurden außerdem vier tierische Seren verwendet. Einmal das polyklonale Serum (R594) eines Kaninchens, das mit einem Teil der NC16A Region auf der Ektodomäne von BP180 (**Abbildung 1**), NC16A 2-4 gekoppelt an Gluthation-S-Transferase (GST), immunisiert worden war (Balding et al, 1997). Damit konnten NC16A, 1050, ein rekombinantes zellmembrannahes Fragment der Ektodomäne von BP180 (**Abbildung 2**), und LAD-1 detektiert werden. Desweiteren ein polyklonales Kaninchenserum (R136), das mit dem GST-Fusionsprotein 4575 (**Abbildung 2**) immunisiert wurde (Balding et al, 1996, 1997). Neben BP180 4575 kann damit das Protein 915 nachgewiesen werden, ein GST-Fusionsprotein, welches den C-Terminus von BP180 darstellt. Der dritte Antikörper ist der murine monoklonale

Antikörper LH 7.2 (Sigma, Deisenhofen) gegen Kollagen Typ VII. Desweiteren wurde ein polyklonales Kaninchenserum gegen rekombinantes GST (Sigma, Deisenhofen) zum Nachweis aller GST- Fusionsproteine und GST eingesetzt.

**Tabelle 1 Ergebnis der direkten Immunfluoreszenz (DIF) sowie Befall der verschiedenen Schleimhäute und der normalen Haut der 26 Patienten dieser Untersuchung.**

Patient	DIF			Auge	Mund	Ösophagus	Genital	Nase	Haut
	IgG	IgA	C3						
SHP-1	+	-	+	+	+	-	-	-	-
SHP-2	+	+	+	+	+	-	-	-	-
SHP-3	+	+	-	-	+	+	-	-	-
SHP-4	+	+	+	-	+	-	-	-	+
SHP-5	+	+	+	+	+	-	-	+	-
SHP-6	+	+	+	+	+	-	+	-	+
SHP-7	+	+	+	-	+	+	-	-	+
SHP-8	+	-	+	-	+	+	-	-	-
SHP-9	+	-	+	+	+	-	+	-	+
SHP-10	+	-	+	+	+	-	+	-	+
SHP-11	-	+	+	+	+	-	+	-	+
SHP-12	-	+	+	+	+	-	+	+	+
SHP-13	+	+	-	-	+	-	-	-	-
SHP-14	+	-	+	-	+	-	+	-	-
SHP-15	-	+	+	+	-	-	-	-	-
SHP-16	+	-	+	+	-	-	-	-	-
SHP-17	-	+	-	+	+	-	-	-	-
SHP-18	+	-	+	+	-	-	-	-	+
SHP-19	+	-	+	+	-	+	-	+	-
SHP-20	+	+	-	+	-	-	-	-	-
SHP-21	+	+	+	+	-	-	-	-	-
SHP-22	-	-	-	+	+	+	-	-	-
SHP-23	+	+	+	+	-	-	-	-	-
SHP-24	+	-	+	+	-	-	+	-	+
SHP-25	-	-	-	+	-	-	-	-	+
SHP-26	-	+	+	+	+	-	+	-	-
	IgG	IgA	C3	Auge	Mund	Ösophagus	Genitale	Nase	Haut
<b>Summe</b>	<b>19</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>17</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>10</b>

### 3.2 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Durch die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) auf humaner Spalthaut wurden Antikörper im Serum der Patienten gegen Bestandteile der DEJ nachgewiesen (Zillikens et al; 1996). Zunächst wird ein Stück humaner Haut in 1 M NaCl- Lösung inkubiert, wodurch ein subepidermaler Spalt entsteht. Von diesem Hautpräparat wurden Gefrierschnitte angefertigt, die mit dem Patientenserum inkubiert wurden. Durch Sekundärantikörper gegen humanes IgG (Binding site, Birmingham, UK) oder IgA (Kallestad Diagnostics, Chaska, USA), die an Fluoreszin-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt sind, liessen sich im Fluoreszenzmikroskop die gebundenen Antikörper an der DEJ nachweisen.

### 3.3 Proteinherstellung

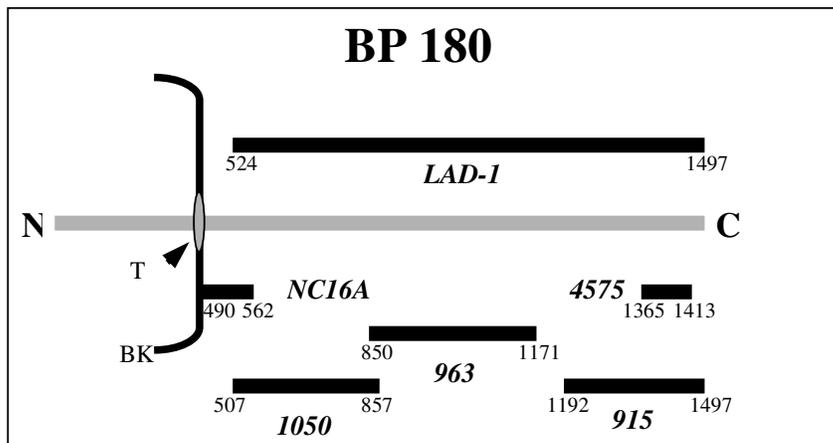
#### 3.3.1 Rekombinante Proteine

##### 3.3.1.1 Expression der GST- BP180 Fusionsproteine

Folgende rekombinanten Fragmente von BP180 wurden in dieser Arbeit als GST-Fusionsproteine verwendet: GST-NC16A (Aminosäurenummer 490-562), GST-4575 (Aminosäurenummer 1365-1413), GST-1050 (Aminosäurenummer 507-857), GST-963 (Aminosäurenummer 850-1171) sowie GST-915 (Aminosäurenummer 1192-1497) (Zillikens et al, 1997a; Georgi et al, 2001).

Außerdem wurde noch die rekombinante Form von GST verwendet. Zur Synthese dieser Proteine wurde mit dem bakteriellen Expressionssystem pGex (Pharmacia, Piscataway, USA) gearbeitet. Zeiten, Mengen, Temperaturen und Besonderheiten in der Zusammensetzung des Extraktionspuffers bei der Expression der verschiedenen Proteine sind der **Tabelle 2** zu entnehmen.

Für die Anzucht des benötigten *E. coli*- Stamms wurde ein Kulturmedium von Luria-Bertani nach Miller verwendet (LBM) [1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt (beide Difco Laboratories, Detroit, USA), 0,17 M Natriumchlorid (NaCl) (Merk, Darmstadt), pH 7,5]. Der pH-Wert wurde mit Natron- (NaOH)- Lauge bzw. Salzsäure (HCl) (Merk) eingestellt. Dann wurden das Kulturmedium autoklaviert, um eine Verunreinigung mit Bakterien zu verhindern und bei +4°C gelagert.



**Abbildung 2** Schematische Darstellung von BP180 und der verwendeten rekombinanten und nativen Fragmente

BP180 ist ein transmembranöses Protein des basalen Keratinozyten (BK) mit einer Typ-II Orientierung, d.h. der Amino- (N)-Terminus befindet sich intrazellulär und der Carboxy- (C)-Terminus extrazellulär. Die rekombinanten Fragmente der BP180-Ektodomäne waren aus technischen Gründen an Glutathion-S-Transferase (GST) gekoppelt (nicht dargestellt). Folgende GST-Fusionsproteine wurden eingesetzt: das membranernahe NC16A, das C-terminale 4575, sowie die Proteine 1050, 963 und 915, die ungefähr die extrazelluläre Domäne von BP180 abdecken. Die Zahlen unterhalb der Enden der Proteine bezeichnen die Aminosäurepositionen.

Zur Präparation der Primärkultur wurden die entsprechende Menge an autoklaviertem LBM-Medium in ein Falcon-Röhrchen gegeben, Carbencillin (Sigma) in der Konzentration 50 mg/ml im Verhältnis 1:1000 hinzugefügt und mit dem bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten *E. coli*-Stamm inokkuliert. Das Kulturröhrchen wurde im Schüttelinkubator über Nacht bei 220 U/min. und der entsprechenden Temperatur inkubiert. Die Primärkultur wurde am nächsten Morgen in einen Erlenmeier-Kolben gegeben, und mit LBM-Medium im Verhältnis 1:50 (Ausnahmen 1. BP915: Verdünnungsverhältnis 1:10; 2. BP963: Verdünnungsverhältnis 1:33 zur Sekundärkultur) verdünnt unter Zusatz von Carbencillin (50mg/ml) (Sigma) im Verhältnis 1:1000. Der Kolben wurde solange im Schüttelinkubator (220 U/min., entspr. Temp.) belassen, bis die Extinktion zwischen 0,5-0,6 im Photometer (Spektralphotometer, Modell PMQ 3, Zeiss, Jena) bei einer Wellenlänge von  $\lambda=600$  nm gegen LBM als Referenzwert erreicht hatte. Daraufhin wurde die Proteinsynthese in den *E. coli*-Bakterien

durch die Hinzugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranoside (IPTG) (0,5M) (Sigma) im Verhältnis 1:1000 induziert für die entsprechende Zeit und Temperatur bei 220 U/min. im Schüttelinkubator.

Die Bakterien wurden bei 6000 U/min. und 4°C, 10 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Bodensatz mit einem Extraktionspuffer [5  $\mu$ g/ml Pepstatin A, 0,01 mg/ml Leupeptinhemisulfat, 0,01 mg/ml Antipainhydrochlorid, 5mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (alle Sigma) in phosphate-buffered saline (PBS) [0,15 M NaCl, 7,75 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,16 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (alle Merk), pH 7,2)] resuspendiert. Je nach Protein wurde der Extraktionspuffer modifiziert (siehe **Tabelle 2**). Mit dem Ultraschallkavitationsgerät (Sonoplus HD-70, Bandelin, Berlin) (60s; Level 10; duty 50%) wurden unter Zugabe von 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma) die Bakterien zerstört und das Protein in den Puffer freigesetzt. Durch die abschließende Zentrifugation (Suprafuge 22, Heraeus, Osterode, 16000 U/min., 4°C, 30 min.) wurde das Protein von den übrigen Zellbestandteilen getrennt. Der Überstand wurde bei -80°C bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

**Tabelle 2: Expression der verwendeten rekombinanten Proteine**

Protein	<i>E. coli</i> Stamm	Primär- kultur	Primär Kultur Temp.	Sekundär Kultur Temp.	IPTG- Induktion	Induktions- temp.	Extraktions- puffer
GST	DH5 $\alpha$	5 ml	37°C	37°C	4 h	37°C	s. o.
NC16A	DH5 $\alpha$	5 ml	37°C	37°C	4 h	37°C	s. o.
4575	DH5 $\alpha$	5 ml	37°C	37°C	4 h	37°C	s. o.
BP1050	XL- Blue	5 ml	37°C	30°C	2 h	30°C	+ 1% Triton*
BP963	TG1	15 ml	30°C	30°C	5 h	20°C	+ 1% Triton*
BP915	BL21	50 ml	20°C	20°C	7 h	14°C	+ 1% Triton*

\*Triton (Sigma)

### **3.3.1.2 Affinitätsaufreinigung der GST- Fusionsproteine**

Das jeweilige rekombinante Protein wurde durch eine säulenchromatographische Affinitätsaufreinigung extrahiert (Zillikens et al 1997a; Georgi et al, 2001; Kromminga et al, 2000). Dazu wurden Glutathion-Agarose-Beads (Sigma) verwendet. Die Beads wurden auf eine chromatographische Säule (BioRad Laboratories, Hercules, USA) gegeben und dreimal mit PBS gespült. Zehn ml des aufzureinigenden Zellextrakts wurde auf Eis von  $-80^{\circ}\text{C}$  aufgetaut, zu den Beads auf die Säule gegeben und 1 h auf dem Taumler bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert, damit die GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Beads binden konnten. Der nicht gebundene Rest wurde aus der Säule abgelassen. Anschließend wurde die Säule viermal mit PBS gewaschen. Bei jedem Durchgang wurde dabei spektralphotometrisch die Extinktion gegen PBS bei  $\lambda=280\text{ nm}$  bestimmt. Ab Werten von  $< 0,2$  wurde das an den Glutathion Beads gebundene GST-Fusionsprotein mit 20 ml Glutathionlösung [20 mM Glutathion (Sigma) in PBS, pH 7,5] ausgewaschen. Das Eluat wurde aliquotiert und für jede Portion spektralphotometrisch die Extinktion gegen reine Glutathionlösung bestimmt. Die Proben mit der höchsten Dichte wurden gepoolt, mit SDS-Lösung im Verhältnis 1:4 versetzt und bis zur Immunoblotuntersuchung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **3.3.2 Native Proteine und Extrakte**

#### **3.3.2.1 Dermales Extrakt**

Aus der Dermis neonataler humaner Vorhäute wurde ein Extrakt gewonnen, das natives Kollagen Typ VII enthält (Zillikens et al, 1996). Dazu wurde von der Vorhaut zuerst das subkutane Fettgewebe entfernt, dann wurde sie 45s in einem Wasserbad bei  $57^{\circ}\text{C}$  erhitzt, damit anschließend die Epidermis von den darunterliegenden dermalen Proteinen mit Hilfe von feinen Pinzetten entfernt werden konnte. Die Dermis wurde für 1 h bei Raumtemperatur in einem Extraktionspuffer der folgenden Zusammensetzung inkubiert: 8 M Harnstoff (Pharmacia), 2% SDS (Merk), 12,5 mM Tris-HCl (Roth, Karlsruhe), 0,1 M Dithiothieitol (DTT), 1 mM PMSF, 2 mM EDTA (alle Sigma) in  $\text{dH}_2\text{O}$ . 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 in einer 6% SDS-PAGE aufgetrennt und elektrophoretisch auf Nitrozellulose transferiert. Im Immunoblot mit dem

monoklonalen Mausantikörper LH 7,2 (1:100) (Sigma) als Positivkontrolle gelang der Nachweis des 290-kDa schweren Kollagen Typ VII.

### **3.3.2.2 Keratinozyten-Extrakt**

Humane Keratinozyten wurden aus der Epidermis von humanen neonatalen Vorhäuten, wie beschrieben, gewonnen (Zillikens et al, 1996).

Aus einer dicht bewachsenen Zellkulturflasche wurde zuerst das Medium (KGM-Medium, BioWhittaker, Walkersville, USA) abgenommen. Die Keratinozyten in der Flasche wurden 2 mal mit PBS gespült, bevor sie mit einem Extraktionspuffer [62,5mM Tris-HCl-Lösung (Roth), 2% SDS, 5% Betamercaptoethanol (beide Merck), 0,1 mM PMSF, 1mM EGTA, 1mM DTT, Pepstatin A, Antipainhydrochlorid, Leupeptinhemisulfat (alle Sigma)] benetzt wurden. Mit einem Zellschaber wurde der Boden nun gründlich abgeschabt und die Zellsuspension mit dem Ultraschallkator (Sonoplus HD-70, Bandelin, Berlin) behandelt (5\*10 Schläge, 60% Power, Cycle 50; 1\*10 Schläge, 100% Power, Cycle 50). Vor jedem Sonikiervorgang wurden 0,1 M PMSF (Sigma) dazugeben. Nach einer Zentrifugation (5000 U/min., 10 min., 4°C) wurde der Überstand abgenommen, mit SDS- Lösung im Verhältnis 1:4 versetzt und 2 min. gekocht. Das native BP180 konnte dann mit Hilfe des polyklonalen Kaninchenserums R594 (1:1000) im Immunoblot nachgewiesen werden.

### **3.3.2.3 HaCaT-Überstand**

LAD-1 wurde aus dem konzentrierten Kulturüberstand einer humanen Keratinozytenlinie (HaCaT) gewonnen (Boukamp et al, 1988; Kromminga et al, 2000). Die HaCaT Zellen wurden dazu in einem serumfreien Keratinozytenwachstumsmedium (KGM, BioWhittaker) mit niedrigem Kalziumgehalt angezchtet, zu dem außerdem bovines Hypophysenextrakt, Epidermal Growth Factor, Insulin und Hydrocortison (alle BioWhittaker) gegeben wurden. Ab einer 70%-igen Konfluenz der Zellen wurden sie für 48h mit L-Ascorbat (Sigma) in einer Konzentration von 100 µg/ml inkubiert. Das Medium wurde gesammelt und sofort mit den Proteaseinhibitoren EDTA (5 mM) und PMSF (1 mM) (Sigma) versetzt. Die zellulären Reste wurden bei 2000 U/min. für 7 min. bei +4°C abzentrifugiert, der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Der Kulturüberstand wurde nun konzentriert. Zuerst wurden die Proteine im Medium in einer 30% Ammoniumsulfatlösung (Merck) für 2 h auf Eis ausgefällt. Dieses Gemisch

wurde für 90 min. bei 16000 U/min. zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet und der proteinhaltige Bodensatz mit einem Puffer der folgenden Zusammensetzung resuspendiert: 25 mM Tris (pH 7,8) (Roth), 65 mM NaCl (Merck), 5 mM EDTA, 1 mM Aminoethylbenzensusfonylfluorid (AEBSF) (alle Sigma).

Nach 2 h auf Eis wurde die Suspension 16 h lang gegen kalten Resuspensionspuffer dialysiert (Spectra/Por 2 Dialysis Membrane, Spectrum Laboratories, Greensboro, USA), um das Ammoniumsulfat aus der Suspension zu entfernen. Das Dialysat wurde zentrifugiert (10000 U/min., 20 min., 4°C) und mit EDTA (5mM), PMSF (1mM) und AEBSF (1mM) (alle Sigma) versetzt. LAD-1 konnte im Immunoblot mit Hilfe des polyklonalen Kaninchenserums R594 (1:1000) nachgewiesen werden.

### **3.4 Westernblot-Untersuchungen**

Mit Hilfe der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die verschiedenen nativen und rekombinanten Proteine aufgetrennt (BioRad Laboratories, Hercules, USA) (Zillikens et al, 1997a). Die verschiedenen Proteine wurden in das entsprechende Polyacrylamidgel (**Tabelle 3**) geladen. Um später aus der Migrationsposition des Proteins auf das Molekulargewicht schließen zu können, wurde außerdem jeweils ein Broad Range SDS-PAGE Standard (BioRad Laboratories) geladen. Die Gelapparatur (BioRad Laboratories) wurde in einen Puffer [25mM Tris, 192mM Glycin (beide Roth), 1% SDS (Merck), pH 8,3] gestellt und die Elektrophorese bei 90 mA, RT, durchgeführt. Danach wurden sie elektrophoretisch auf Nitrozellulose transferiert. In einem Transferpuffer [25mM Tris, 192 mM Glycin (beide Roth), 20% Methanol (Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland), pH 8,39] wurden die Proteine bei 35 V, 135mA und 4°C elektrophoretisch auf die Nitrozellulose übertragen. Der Erfolg des Verfahrens wurde mittels einer Fast-Green-Färbung [2 min. anfärben mit 0,1% Fast Green FSF (Sigma), 10% Methanol (Mallinckrodt Baker), 5% Essigsäure (Roth); danach 2 min. waschen mit dH<sub>2</sub>O] der Nitrozellulose überprüft.

Zur Westernblotuntersuchung wurde die Nitrozellulose 45 min. bei RT mit einer Magermilchlösung (3% Magermilchpulver (Merck) in TBST) inkubiert, um eventuelle unspezifische Antikörperreaktionen zu blockieren, und dann 25 min. mit TBST gewaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit den Seren bei RT auf dem Taumler.

Nach einem Waschgang mit TBST für 25 min. wurden sie mit einem Peroxidasekonjugiertem Sekundärantikörper bei RT für 1 h inkubiert.

**Tabelle 3** Zusammensetzung der Polyacrylamidgele bei der Separation der verschiedenen Proteine

Reagenz	Trenngel				Sammelgel*	
	6%	8%	10%	15%	4%	5%
destilliertes Wasser (ml)	5,38	4,71	4,08	2,35	3,01	2,85
1,5 M Tris (pH 8,8) (Roth) (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	---	---
0,5 M Tris (pH 6,8) (ml)	---	---	---	---	1,25	1,25
30% Acrylamid (BioRad Laboratories) (ml)	2,0	2,67	3,3	5,0	0,67	0,83
10% SDS (Merk) (µl)	100	100	100	100	50	50
Tetramethylethylendiamin (Sigma) (µl)	12	12	12	12	12	12
10% Ammoniumpersulfat (Sigma) (µl)	50	40	35	30	50	25
<b>Protein</b>	KC-E, DE	LAD-1	915, 963, 1050	NC16A, 4575, GST		

\* 4% Sammelgele wurden mit 6-8% Trenngelen, 5% mit 10-15% Trenngelen kombiniert. DE, dermales Extrakt; KC-E, Keratinozytenextrakt.

Folgende Sekundärantikörper wurden in den zugehörigen Verdünnungen (in 1% BSA-TBST) eingesetzt: Ziege-anti-Kaninchen polyklonale Immunglobuline 1:5000, Kaninchen-anti-Maus 1:10000; Kaninchen-anti-humanes IgG 1:15000 (alle DAKO, Glostrup, Dänemark); Kaninchen-anti-humanes IgA 1:20000 (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, USA);

Nach einem weiteren Waschschrift (TBST, 25min., RT) wurden die gebundenen Antikörper mit Hilfe eines enhanced chemolumineszens- Systems (ECL) (Amersham, Little Chalfont, Birminghamshire, UK) mittels eines Chemofluoreszenzfilms (Hyperfilm

ECL, Amersham) visualisiert. Die Ergebnisse wurden bei optimaler Exposition dokumentiert und ausgewertet.

### **3.5 Immunadsorptionen**

Bei der Testung der menschlichen Seren hinsichtlich ihrer Reaktivität gegen die GST-Fusionsproteine NC16A, 4575, 1050, 963 und 915 wurden die Seren vorher mit rekombinantem GST präadsorbiert, um eine unspezifische Reaktivität gegen den GST-Anteil des Fusionsproteins zu verhindern (Zillikens et al, 1997a; Georgi et al, 2001; Kromminga et al, 2000).

Dazu wurde zuerst mittels Immunoblot für jedes Serum die Menge an unaufgereinigtem rekombinanten GST bestimmt, bei der keine Antikörperbindung mehr auf einer mit rekombinanten GST überladenen Nitrozellulose nachweisbar war. Die Seren wurden mit unaufgereinigtem GST-haltigen Zellysat und 1% BSA (Sigma) in tris-buffered saline plus tween Puffer (TBST) [0,02 M Tris (Roth), 0,15 NaCl, 0,01 % Tween-20 (Sigma), pH 7,5] im Verhältnis 1:100 für den IgG-Nachweis und 1:20 für den IgA-Nachweis verdünnt. Über Nacht wurden sie bei 4°C auf dem Taumler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die gebildeten Immunkomplexe bei 14000 U/min. und 4°C abzentrifugiert. Der Anteil des unaufgereinigten GST an der Verdünnung der Seren wurde solange gesteigert, bis keine Reaktivität mit GST im Immunoblot mehr nachweisbar war. In dieser Verdünnung wurden die Seren in der Immunoblotanalyse mit den verschiedenen GST-Fusionsproteinen eingesetzt.

### **3.6 Immunpräzipitation mit Laminin 5**

Die Immunpräzipitationsuntersuchungen wurden im Labor von Dr. Kim Yancey, Milwaukee, durchgeführt und bereits detailliert beschrieben (Leverkus et al, 1999; Stanley et al, 1981; Basset-Seguin et al, 1990).

## 4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden die Serumautoantikörper von 26 Patienten mit SHP charakterisiert. Im Immunoblot wurde die Reaktivität der Seren mit dem 180-kDa schweren BP-Antigen BP180 getestet. Dabei wurden zum einen verschiedene rekombinante Formen von BP180 verwendet. Die GST-Fusionsproteine GST- NC16A, GST- 4575, GST- 1050, GST- 963 und GST- 915 wurden in *E. coli* exprimiert und im Westernblot eingesetzt (**Abbildung 2**). Zusätzlich zu den rekombinanten Abschnitten wurde die native Form der BP180-Ektodomäne (LAD-1) verwendet, die aus einem Extrakt kultivierter humaner Keratinozyten gewonnen wurde. Ferner wurden die Patientenseren im Immunoblot mit einem dermalen Extrakt auf ihre Reaktivität gegen Kollagen Typ VII und mittels Immunpräzipitation radioaktiv-markierter humaner Keratinozyten auf Reaktivität gegen Laminin 5 untersucht. Die Ergebnisse der einzelnen Patientenseren in der IIF, im Immunoblot mit den verwendeten BP180-Fragmenten bzw. mit Kollagen VII und die Laminin 5 Reaktivität können der **Tabelle 4** entnommen werden.

Autoantikörper gegen die NC16A-Region enthalten 50% der getesteten Seren. Mit 11 von 26 Patienten (42%) fand sich die höchste IgG-Reaktivität gegen NC16A, nur 5 (19%) zeigten IgA-Antikörper gegen diesen Abschnitt von BP180. Mit dem 49 Aminosäuren langen C-terminalen Protein 4575 reagierten 7 von 26 Seren (27%). Dabei fanden sich bei 5 der Seren (19%) IgG- und bei 4 (15%) IgA- Antikörper.

IgG-Antikörper gegen GST-1050, GST-963 und GST-915 wurden bei 3 (11%), 2 (7,5%) bzw. bei 4 (15%) gefunden werden. IgA- Antikörper wurden bei 4 (15%), 4 (15%) bzw. bei 6 (23%) Patienten gefunden. Beispielhaft wird die Reaktivität von drei Patientenseren mit den rekombinanten BP180-Fragmenten in **Abbildung 3** dargestellt.

**Tabelle 4** Ergebnisse der Patientenseren in der indirekten Immunfluoreszenz auf Spalthaut (IIF auf SpH), im Immunoblot mit rekombinanten Fragmenten von BP 180 (915, 963, 1050, 4575 und NC16A) und nativem BP 180 (LAD-1 und KC-E [Keratinocytenextrakt]), Kollagen Typ VII (DE: dermales Extrakt) und mittels Immunpräzipitation (Laminin 5 [LAM5])

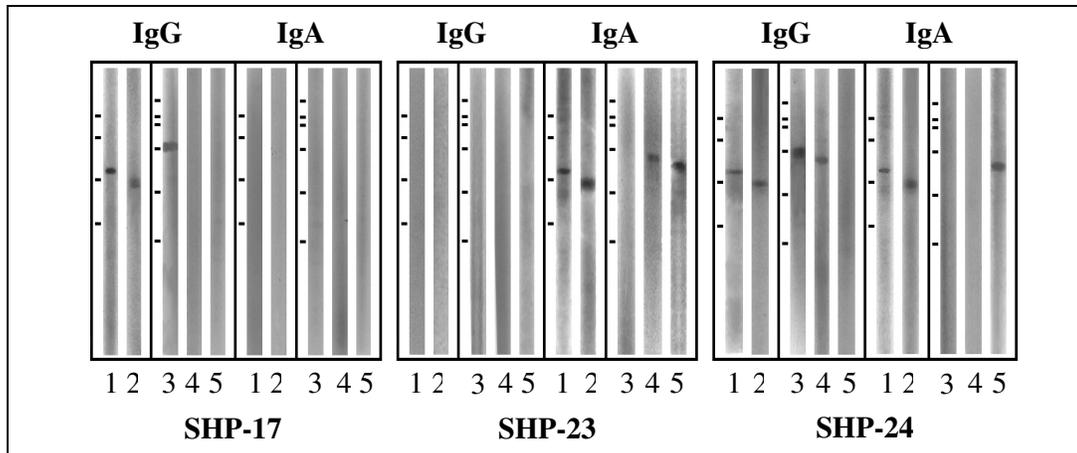
Pat.-Nr.	IIF auf SpH		915		963		1050		4575		NC16A		KC-E		LAD-1		DE		LAM 5
	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG
SHP-1	1:20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SHP-2	-	1:10	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
SHP-3	1:20*	1:10	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
SHP-4	1:40	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
SHP-5	1:40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
SHP-6	1:320*	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
SHP-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
SHP-8	1:2*	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
SHP-9	1:20*	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
SHP-10	1:40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
SHP-11	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
SHP-12	1:40*	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
SHP-13	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SHP-14	1:160	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
SHP-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
SHP-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
SHP-17	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SHP-18	-	1:320	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SHP-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
SHP-20	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHP-21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SHP-22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHP-23	-	1:20	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
SHP-24	1:80	1:40	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
SHP-25	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SHP-26	1:20	1:10	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
<b>Summe</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>11</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7</b>
<b>%</b>	<b>46</b>	<b>23</b>	<b>15</b>	<b>23</b>	<b>8</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>15</b>	<b>19</b>	<b>15</b>	<b>42</b>	<b>19</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>27</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>27</b>

\* Reaktivität im Blasenboden nachgewiesen, bei SHP-8 zusätzlich im Blasendach.

Reaktivität mit der nativen vollen Länge von BP180 aus kultivierten humanen Keratinozyten wurde nur bei insgesamt 4 Patienten gefunden. Jeweils 2 hatten IgG bzw. IgA-Antikörper. Ein Patient reagierte nur mit dem nativen BP180, nicht jedoch mit den rekombinanten Formen oder LAD-1.

Reaktivität gegen LAD-1 wurde in insgesamt 8 der 26 (30%) Patientenseren im Immunoblot gefunden, in 7 Fällen (27%) IgA- und in 3 Fällen (12%) IgG-Reaktivität. 3 Seren zeigten Antikörper gegen LAD-1, nicht jedoch gegen BP180. Beispielhaft wird die

Reaktivität von drei Patientenseren mit den rekombinanten BP180-Fragmenten in **Abbildung 4** dargestellt.



**Abbildung 3. Extrazelluläre Epitope von BP180 werden sowohl von IgG- als auch von IgA-Antikörpern erkannt.**

Die GST- Fusionsproteine NC16A und 4575 (Spur 1 und 2) wurden mittels 15%, 1050, 963 und 915 (Spur 3, 4 und 5) mittels 10% SDS- PAGE aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose transferriert.

Die unterschiedlichen Reaktivitätsmuster der Seren mit verschiedenen rekombinanten Abschnitten von BP180 werden beispielhaft an Hand von 3 Schleimhautpemphigoid (SHP)-Patienten gezeigt. Im Serum von SHP-17 fanden sich IgG- Antikörper gegen NC16A, 4575 und 1050. Dagegen zeigt SHP-23 nur IgA-Antikörper, die gegen NC16A, 4575, 963 und 915 gerichtet sind. SHP-24 hat sowohl IgG- als auch IgA-Reaktivität gegen BP180. In jedem Kasten sind die Molekulargewichtsmarker gezeigt, die sich aufgrund unterschiedlicher SDS-PAGE (Spur 1 und 2 in 15%-Gel, Spur 3, 4 und 5 in 10%) verschieden aufgetrennt haben. Sie stellen jeweils 200, 116, 97, 66 und 45 kDa dar.

Keines der untersuchten Seren wies Immunoblotreaktivität mit Typ VII Kollagen auf.

Durch Immunpräzipitation radioaktiv markierter Keratinozyten konnte bei 7 Patienten Autoantikörper gegen Laminin 5 nachgewiesen werden. Bei 4 der 7 Seren zeigte sich eine Antikörperreaktion im Blasenboden in der IIF. Bei SHP-8 wurde zusätzlich eine Reaktion im Blasendach gefunden. Fünf dieser Patienten wiesen zusätzlich eine Antikörperreaktivität im Immunoblot gegen BP180 auf.

Durch Kombination der Westernblotuntersuchungen mit den rekombinanten BP180-Fragmenten NC16A, 4575 und 915 sowie LAD-1 waren bei jedem der 19 SHP-Patienten, die keine Laminin 5 Reaktivität zeigten, Autoantikörper gegen BP180 detektierbar. Mit Hilfe der Fragmente NC16A und LAD-1 gelang der Nachweis von anti-BP180-Antikörpern bei 16 der 19 (84%) SHP-Patienten ohne Laminin 5 Reaktivität. Zwei Patientenseren reagierten alleine mit dem C-terminalen Abschnitt der BP180 Ektodömäne. Die Ergebnisse der 19 SHP-Patienten, die keine Laminin 5 Reaktivität zeigten, sind in **Tabelle 5** zusammengefasst.

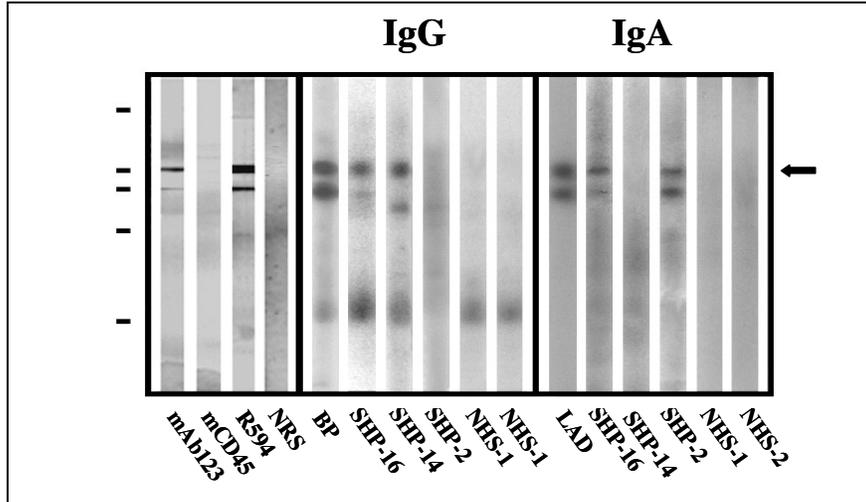
**Tabelle 5. Nachweis von IgG- und IgA-Autoantikörpern in der direkten IF (DIF) periläsionaler Haut, indirekten IF auf humaner NaCl-separierter Spalthaut (IIF) und im Immunoblot mit verschiedenen rekombinanten Fragmenten von BP180 bei den 19 Schleimhautpemphigoid-Patienten ohne Laminin 5 Reaktivität**

	<b>DIF</b>	<b>IIF</b>	<b>NC16A</b>	<b>LAD-1</b>	<b>4575</b>	<b>915</b>
<b>IgG</b>	14	7	10	3	4	2
	74%	37%	53%	16%	21%	11%
<b>IgA</b>	12	6	4	7	4	4
	63%	32%	21%	37%	21%	21%
<b>Total</b>	17	10	11	8	6	6
	90%	53%	58%	42%	32%	32%
			Zusammen 16 (84%)			

DIF, direkte Immunfluoreszenz; IIF, indirekte Immunfluoreszenz.; Westernblotuntersuchung mit rekombinanten BP180-Fragmente NC16A, 4575 und 915 sowie löslicher BP180-Ektodomäne LAD-1

Insgesamt wurden durch die Immunoblotuntersuchung bei 24 der 26 Patientenseren, also bei 92%, IgG- oder IgA-Autoantikörper gegen BP180 gefunden; dabei ist der Anteil an IgG- und IgA- Reaktivität gleich hoch, nämlich jeweils 65% der Fälle.

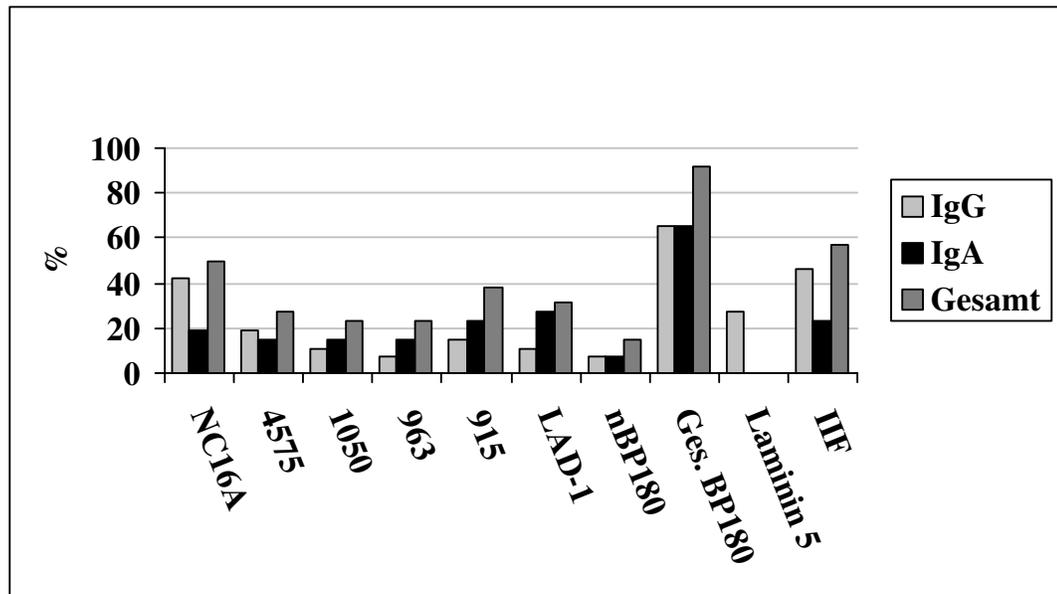
Im Gegensatz dazu wurden bei der IIF nur in 15 der 26 Fälle (58%) Antikörper gegen Strukturen der DEJ detektiert. 12 Seren (46%) zeigen IgG gegen Strukturen der DEJ, 7 davon banden im Dach der Blase, 5 am Boden. Ein Patient (SHP-8) zeigte eine Reaktion an beiden Lokalisationen. IgA-Immunglobuline wurden in 6 Fällen (23%) im Dach der Blase gefunden. Die Titer reichten von 1:2 bis 1:320.



**Abbildung 4.** Die lösliche native Ektodomäne von BP180 wird hauptsächlich von IgA-Antikörpern bei Patienten mit SHP erkannt.

LAD-1 wurde mittels 8% SDS PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferriert. Im Immunoblot reagierten mit LAD-1 der monoklonale Mausantikörper mAb123, polyklonales Kaninchenserum R594 (gegen BP180 NC16A), Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid und Linearer IgA-Dermatose sowie 3 repräsentative Schleimhautpemphigoid-Patientenseren (SHP-16, SHP-14, SHP-3). Als Kontrollen dienten der monoklonale Mausantikörper mCD45 (gegen humanes CD45), ein normales Kaninchenserum und 2 Seren gesunder Kontrollpersonen (NHS-1 und NHS-2). Der Pfeil (rechts) markiert die Migrationsposition von LAD-1. Die Molekulargewichtsmarker (links) entsprechen 200, 116, 97, 66 und 45 kDa.

In dieser Arbeit wurden bei allen Patienten mit SHP zirkulierende Autoantikörper nachgewiesen und das jeweilige Antigen spezifiziert. Bei 19 Patienten wurden Autoantikörper gegen BP180 detektiert; 7 Patienten zeigten Laminin 5 Reaktivität, wobei bei 5 Patienten Antikörper sowohl gegen BP180 als auch gegen Laminin 5 nachgewiesen wurden (**Abbildung 5**).



**Abbildung 5.** Prozentuale Ergebnisse der IgG-, IgA- und der Gesamtreaktivität der 26 SHP-Patientenseren im Immunoblot mit den verschiedenen nativen (nBP180 und LAD-1) und rekombinanten (NC16A, 4575, 1050, 963 und 915) Formen von BP180, durch Immunpräzipitation radioaktiv markierter Keratinozyten (Laminin 5) und in der IIF. Ges. BP180, Gesamtreaktivität mit BP180.

## 5 Diskussion

In der Vergangenheit war es oft schwierig, bei Patienten mit SHP das jeweilige Zielantigen der Autoantikörper zu identifizieren. Nur in etwa der Hälfte der Fälle konnten durch die IIF Antikörper im Serum nachgewiesen werden (Übersicht in Yancey, 2003). Auch in Immunoblotuntersuchungen wurden bei einem Teil der Patienten keine Autoantikörper gefunden. Das häufigste Antigen, gegen das man beim SHP Autoantikörperreaktivität findet, ist BP180 (Balding et al, 1996; Murakami et al, 1998; Nie et al, 1999).

Das 180 kDa schwere BP-Antigen BP180, auch Typ XVII Kollagen genannt, wurde in der Vergangenheit als Zielantigen verschiedener subepidermal blasenbildender Autoimmundermatosen identifiziert, nämlich BP, LLP, PG, LAD und SHP. Deshalb stellte sich die Frage, wie Antikörper gegen dasselbe Protein zu der unterschiedlichen klinischen Ausprägung dieser Hautkrankheiten führen. In mehreren Arbeiten wurde die Vermutung geäußert, daß die Ursache dafür durch Unterschiede der Feinspezifität der Autoantikörper bedingt sein könnte, die unterschiedliche Epitope auf BP180 erkennen (Bedane et al, 1997). Andererseits könnte die Zugehörigkeit der Autoantikörper zu unterschiedlichen Immunglobulinklassen die unterschiedliche Klinik bedingen. Diese Vermutungen werden durch verschiedene Beobachtungen gestützt. Durch Immunelektronenmikroskopie fanden Bedane et al (1997), daß BP-Antikörper in der Lamina lucida nahe der Zellmembran binden. Außerdem wurde im Immunoblot eine immundominante Region innerhalb der 16. nichtkollagenen Domäne (NC16A) der BP180 Ektodomäne für BP und PG-Patienten identifiziert (Giudice et al, 1993; Zillikens et al, 1997b), die unmittelbar an den transmembranösen Teil anschließt. Beim SHP dagegen binden die Antikörper immunelektronenmikroskopisch am Übergang der Lamina lucida zur Lamina densa (Bernard et al, 1990). In Arbeiten von Balding et al. (1996), Murakami et al. (1998) und Nie et al. (1999) wurde deutlich, daß neben der NC16A-Domäne auch ein C-terminales Epitop von Antikörpern im Serum eines Großteils der SHP-Patienten erkannt wird.

Zur Charakterisierung der Autoantikörper wurden in der vorliegenden Arbeit 26 Patienten mit dem klinischen und immunfluoreszenzoptischen Bild des SHP hinsichtlich ihrer Autoantikörperreaktivität gegen das native BP180, gegen 5 sich teilweise überlappende rekombinante Abschnitte von BP180 und gegen LAD-1 untersucht. Dabei wurden in 24

von 26 Seren Autoantikörper gegen BP180 detektiert. Es zeigten jeweils 17 Patienten IgG- bzw. IgA- Antikörper. Dadurch wird deutlich, daß beim SHP sowohl auf IgG- als auch auf IgA-Reaktivität getestet werden sollte. Alleine durch den Einsatz von NC16A, LAD-1 und dem Protein 915 konnten in 22 (84%) der 26 Patientenseren anti-BP180-Antikörper nachgewiesen werden.

Obwohl im Immunoblot insgesamt bei 92% aller Patienten Antikörper gegen BP180 gefunden wurde, zeigte der Immunoblot unter Verwendung von Keratinozytenextrakt, in dem nachweislich natives BP180 vorhanden war, eine geringere Sensitivität. Bei jeweils 2 Patienten wurden IgG bzw. IgA Antikörper nachgewiesen. Dies kann durch die geringere Proteinmenge des nativen BP180 im Extrakt im Gegensatz zur Verwendung rekombinanter Formen erklärt werden. Eines unserer Seren (SHP-10) zeigte dagegen nur im Westernblot des Keratinozytenextrakts eine Reaktivität mit BP180, nicht jedoch mit den rekombinanten Teilabschnitten. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß dieser Patient Antikörper gegen ein Epitop entwickelt hat, das nicht auf den rekombinanten Formen von BP180 vorhanden ist (vgl. **Abb. 2**).

In mehreren Arbeiten wurden bisher Autoantikörper gegen BP180 in Patienten mit SHP untersucht. Es fanden sich zwei immundominante Regionen auf der BP180-Ektodomäne. Balding et al (1996) zeigten, daß 70% der untersuchten Seren entweder mit einem zellmembrannahen rekombinanten Abschnitt der Ektodomäne von BP180 (NC16A) reagieren oder mit einem rekombinanten C-terminalen Abschnitt, oder mit beiden. Murakami et al (1998) fanden bei 44% von 50 untersuchten SHP-Seren auch IgA-Antikörper, die in der indirekten IF an der epidermale Seite der Blase banden, im Immunoblot aber kaum Reaktivität zeigten. Außerdem beobachteten sie im Immunoblot IgG-Antikörper gegen NC16A und den C-Terminus in 36% bzw. 40% der Seren. Nie et al (1999) teilten die Ektodomäne von BP180 in drei rekombinante Proteine auf und testeten damit 10 Seren von SHP- Patienten. Jeweils 50% hatten IgG- Antikörper gegen das zellmembrannahe oder das C- terminale Protein, 40% gegen beide. Außerdem zeigten 40% der Seren IgA- Antikörper gegen den BP180 C- Terminus.

Durch die Verwendung der rekombinanten Abschnitte NC16A, 4575, 915, 963 und 1050, die ungefähr dem gesamten extrazelluläre Anteil von BP180 entsprechen, konnten in 20 der 26 SHP-Seren anti-BP180-Autoantikörper detektiert werden. Gegen das mittlere BP180-Drittel (Fragment 963) zeigten sich nur bei 6 Patienten Antikörper. Im Einklang

mit der o. g. Literatur konnten zwei immundominante Regionen auf den restlichen Abschnitten festgestellt werden. Zum einen die NC16A-Region, gegen die 11 Seren IgG-Antikörper, und 5 Seren IgA-Antikörper aufwiesen. Die Tatsache, daß dagegen durch das 1050-Fragment, das einen Teil der NC16A-Domäne enthält, nur in 3 bzw. 4 Patientenseren IgG- bzw. IgA-Autoantikörper nachgewiesen wurde, legt die Vermutung nahe, daß die anti-NC16A-Antikörper ein Epitop innerhalb der N-terminalen 28 Aminosäuren von NC16A erkennen, das im 1050-Protein nicht enthalten ist (**vgl. Abb. 2**). Dies konnte inzwischen von Kromminga et al (2002) gezeigt werden. Im Vergleich zu BP stellt die Immundominanz der NC16A-Region eine Gemeinsamkeit mit dem SHP dar (Zillikens et al 1997a, 1997b; Kromminga et al 2000), auch wenn bei BP in über 90% der Seren Antikörper dagegen gefunden werden.

Die weitere immundominante Region stellt der BP180-C-Terminus dar. Eine Reaktivität gegen die rekombinanten Fragmente 4575 und 915 ergab sich bei 14 unserer SHP-Patienten (54%). Dieses Ergebnis bestätigt Arbeiten von Balding et al. (1996), Murakami et al. (1998) und Nie et al. (1999), die neben der NC16A-Domäne auch ein C-terminales Epitop auf der BP180-Ektodomäne beschreiben. Unsere Seren wiesen eine Diskrepanz hinsichtlich der Reaktivität mit 915 und 4575 auf. Die IgG-Reaktivität gegen 4575 ließ sich in 5 Fällen an Hand von 915 nicht nachvollziehen, die IgA-Reaktivität nur in 2 Fällen. Dies ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Konzentrationen der Proteine im Immunoblot zurück zu führen.

Die Rolle der Autoantikörper gegen den C-Terminus von BP180 in der Pathogenese des SHP ist noch nicht klar. Man vermutet jedoch, daß sie für die tiefere Spaltbildung im Vergleich zu BP- nämlich am Übergang zur Lamina densa (Bernard et al, 1990)-verantwortlich sind und dadurch die Vernarbung der Läsionen entsteht. In der Tat ist beim BP eine präferenzielle Reaktivität der Autoantikörper mit dem BP180 C-Terminus nicht beschrieben. Dagegen berichten Georgi et al. (2001), daß Seren von Patienten mit LAD vor allem IgA-Antikörper gegen den C-Terminus von BP180 enthalten. Interessanterweise zeigte ein Teil dieser Patienten auch eine Vernarbung der Läsionen.

Über das Potential von Antikörpern gegen den C-Terminus von BP180 Blasen zu bilden, kann im Moment nur spekuliert werden. Immerhin stellt diese Region der Ektodomäne von BP180 einen wichtigen Abschnitt mit Blick auf Interaktionen mit anderen Proteinen der DEJ dar. Reddy et al (1998) berichten, daß die  $\beta$ 3-Untereinheit von Laminin 5 mit dem C-

Terminus von BP180 interagiert und diese Interaktion *in vitro* durch anti-BP180-Antikörper unterbunden werden kann. Diese Beobachtung bedarf jedoch noch einer Bestätigung. Erst kürzlich wurde gezeigt, daß humane anti-Laminin 5-Antikörper unabhängig von Komplement- und Neutrophilenaktivierung eine subepidermale Blasenbildung bewirken können (Lazarova et al 2000). Aufschlussreich wäre zu erfahren, ob die Blasenbildung auch durch Autoantikörper gegen den C-Terminus von BP180 möglich ist, und ob sie ebenso unabhängig von der Komplement- und Neutrophilenaktivierung geschieht.

Das LAD-1-Protein wurde ursprünglich als Autoantigen der linearen IgA-Dermatose (LAD) beschrieben (Marinkovich et al, 1996). Später wurde klar, daß LAD-1 die lösliche Ektodomäne von BP180 darstellt (Pas et al, 1997; Schäcke et al, 1998), deren N-Terminus im Bereich der NC16A-Domäne liegt (Hirako et al., 2003) (vgl. **Abb. 2**). Deshalb ist es nicht überraschend, daß auch in Seren von Patienten mit BP oder SHP Antikörper gegen LAD-1 gefunden wurden (Kromminga et al, 2000; Schuhmann et al, 2000; Roh et al 2000). Von unseren 26 SHP- Patienten, die im Immunoblot mit diesem Protein untersucht wurden, hatten 8 (30%) Antikörper gegen LAD-1. Interessanterweise fanden sich in 7 (27%) Seren IgA- Autoantikörper gegen LAD-1. Diese Ergebnisse zeigen, daß das ursprünglich als Autoantigen der LAD beschriebene Protein auch von Immunglobulinen im Serum von Patienten mit SHP erkannt wird und bestätigt die Ergebnisse anderer Arbeiten. So konnten Schuhmann et al (2000) bei allen 6 untersuchten SHP- Seren IgG-Antikörper gegen die abgespaltene Ektodomäne und auch gegen das native BP180 nachweisen. Roh et al (2000) fanden bei 4 von 11 SHP-Seren durch Immunopräzipitation IgG-Antikörperreaktivität gegen LAD-1. Die Unterschiede in der Häufigkeit zu anderen Arbeiten sind am ehesten durch technische Unterschiede (z.B. Antikörperkonzentration, Verdünnung der Seren, Menge des verwendeten Proteins im Immunoblot) und die zum Teil geringe Zahl untersuchter Seren zu erklären. Drei unserer Seren zeigten ausschließlich LAD-1 Reaktivität. Dies ist möglicherweise auf eine spezifische Antikörperreaktivität gegen Epitope zurückzuführen, die nicht auf den rekombinanten Fragmenten vorhanden sind. Andererseits könnten die Antikörper auch gegen Neoepitope gerichtet sein, die bei der proteolytischen Abspaltung der BP180-Ektodomäne entstehen (Marinkovich et al, 1996; Pas et al, 1997; Zone et al, 1990 und 1998; Hirako et al, 1998).

Im Gegensatz zu den Immunoblotuntersuchungen und im Einklang mit anderen Untersuchungen (Yancey, 2003; Kelly et al, 1988; Balding et al, 1996; Murakami et al, 1998) wiesen unsere Patienten in der IIF auf humaner Spalthaut nur in 15 Fällen (58%) Autoantikörper gegen Strukturen der DEJ auf. Bei 3 Seren (SHP-6, SHP-9 und SHP-12) konnte nur Reaktivität mit der dermalen Seite der Spalthaut beobachtet werden, während in den Immunoblotuntersuchungen Antikörper gegen BP180 nachgewiesen wurden. Diese Ergebnisse weisen einerseits auf eine höhere Sensitivität der Westernblotuntersuchungen gegenüber der IIF hin; andererseits gelang es uns bei einem Patienten (SHP-3) nicht, unter Verwendung von dermalem Extrakt oder der Immunpräzipitation humaner Keratinozyten Autoantikörper gegen das p200 Antigen, Typ VII Kollagen oder Laminin 5 zu detektieren. Das Zielantigen der dermal bindenden Autoantikörper dieses SHP-Patienten blieb also unklar.

Reaktivität gegen die dermale Seite der artifiziellen Blase in der IIF auf humaner Spalthaut wurde bei Patienten mit anti p200-Pemphigoid (Zillikens et al, 1996), EBA (Woodley et al, 1984) und Patienten mit SHP und Laminin 5 Reaktivität gefunden (Leverkus et al, 1999). Nachdem keiner unserer dermal bindenden Patienten mit p200 oder Typ VII Kollagen im Westernblot mit dermalem Extrakt reagierte, wurden alle Seren durch zusätzliche Immunpräzipitationsuntersuchungen radioaktiv markierter Keratinozyten auf Reaktivität gegen Laminin 5 getestet. Dabei konnte bei 7 Patienten Antikörper gegen Laminin 5 gefunden werden, 5 dieser Seren reagierten mit der dermalen Seite in der IIF. Ebenfalls konnte bei diesen 5 Seren Immunglobuline gegen BP 180 gefunden werden. Dies könnte ein weiteres Beispiel für ein immunologisches Phänomen sein, das „*epitope-spreading*“ genannt wird. Dabei wird eine Entzündungsreaktion durch Antikörper gegen ein bestimmtes Protein ausgelöst. Durch die Zellschädigung können dann weitere Proteine oder auch andere Epitope desselben Proteins dem Immunsystem als Antigene präsentiert werden und als weiterer Angriffspunkt genutzt werden (Chan, 1998). Obwohl „*epitope-spreading*“ eigentlich ein schützender Mechanismus ist, der die Immunantwort gegen Tumor- und mikrobiologische Antigene verstärkt, wird sein Mitwirken in der Pathogenese einiger Autoimmunerkrankungen diskutiert, z.B. bei multipler Sklerose, systemischem Lupus erythematodes oder der Antikörperreaktion gegen BP180 und BP230 beim BP (Vanderlugt et al, 2002; Chan et al 1998). Das kombinierte Auftreten von Autoantikörpern

gegen dermale und epidermale Strukturen der DEJ bei SHP ist mehrfach beschrieben (Bernard, 1990; Caux, 1996; Yancey, 2003).

Das kombinierte Auftreten von Autoantikörpern gegen BP180 und Laminin 5 wurde bisher bei 2 Patienten beobachtet. Ein Patient litt unter einem SHP (Kawahara et al, 1998), bei dem anderen zeigte sich klinisch ein großflächiges vernarbendes Pemphigoid mit minimaler Schleimhautbeteiligung (Mulyowa et al, 2006).

Das Auftreten eines Laminin 5 Pemphigoid in Verbindung mit einer Krebserkrankung, insbesondere mit einem Adenokarzinom, wurde bereits mehrfach in Einzelfällen beschrieben. Egan et al, 2001 fanden bei 10 von 35 (29%) US-amerikanischen Patienten mit Laminin 5-SHP ein Adenokarzinom 14 Monate vor oder nach Auftreten der Hauterkrankung. Eine japanische Arbeitsgruppe berichtet von dem Auftreten einer Krebserkrankung bei 5 von 16 (31%) Patienten mit Laminin 5 Pemphigoid (Matsushima et al, 2004). 2 von 7 unserer Patienten (SHP-8 und SHP-9) mit Laminin 5- Reaktivität litten gleichzeitig an einem Karzinom (Kolon- bzw. Endometrium-karzinom). Angesicht der Tatsache, dass bis zu 30% der SHP Laminin 5 Pemphigoide sind (Leverkus et al, 1999), ist deshalb der Nachweis von Laminin 5 Antikörpern von entscheidender Bedeutung mit Blick auf das weitere diagnostische und therapeutische Vorgehen.

Für den klinischen Alltag bedeuten die Ergebnisse, dass durch die Kombination der Westernblotuntersuchungen mit den rekombinanten Abschnitten von BP180 NC16A, 4575 und 915 sowie mit der nativen Ektodomäne LAD-1 bei allen Patienten, die keine Laminin 5- Reaktivität aufweisen, Autoantikörper gegen BP180 nachgewiesen werden können. Schon durch die Kombination von NC16A und LAD-1 wurden im Westernblot bei 84% der Patienten BP180-Reaktivität detektiert. Dies könnte die Autoimmundiagnostik vereinfachen und bei Therapieentscheidungen oder im Krankheitsverlauf hilfreich sein.

Die EBA ist eine subepidermal blasenbildende Autoimmundermatose, die klinisch unter dem Bild eines SHP verlaufen kann (Gammon et al, 1984). Die EBA mit überwiegendem Schleimhautbefall wird seit kurzem zum SHP gezählt (Chan et al., 2002). Typischerweise finden sich im Serum der EBA-Patienten Autoantikörper gegen Kollagen Typ VII, das der Hauptbestandteil der Ankerfibrillen in der Sublamina densa Region ist (Woodley et al, 1984; Gammon et al, 1993). Kollagen Typ VII ist ein homotrimeres Glykoprotein, das aus

drei  $\alpha 1$ -Ketten besteht. Die erste nicht-kollagene (NC1)-Domäne jeder Kette formt den großen globulären N-Terminus. Dieser wird durch eine triplehelikale Kollagendomäne mit der kleineren globulären NC2-Domäne, dem C-Terminus, verbunden. Die Ankerfibrillen entstehen durch Aggregation mehrerer Kollagen Typ VII-Dimere, wobei die NC2-Domäne abgespalten wird (Übersicht in Bruckner-Tuderman 1994 und 1999). Die Enden bestehen aus den NC1-Domänen und interagieren u. a. mit Laminin 5 (Chen et al, 1999).

Um die Reaktivität und Typ VII Kollagen bei unseren 26 SHP-Seren zu untersuchen, führten wir Immunoblot-Untersuchungen und dermale Extrakte durch. Obwohl 5 Seren in der IIF mit der dermalen Seite reagierten, wurden im Immunoblot in keinem Serum Antikörper gegen Typ VII Kollagen nachgewiesen. Angesichts der relativ großen Zahl an untersuchten SHP-Seren scheinen Antikörper gegen Typ VII Kollagen bei Patienten mit SHP, im Einklang mit der Literatur (Yancey, 2003; Mutasim 2004), nur selten vorzukommen.

Zusammengenommen konnte in dieser Arbeit bei allen Seren von Patienten mit SHP, die keine Antikörper gegen Laminin 5 aufwiesen, Antikörperreaktivität gegen BP180 im Immunoblot nachgewiesen werden. Dem gegenüber zeigte die IIF humaner Spalthaut mit 58% eine deutlich niedrigere Sensitivität. Durch die Kombination von Westernblotuntersuchungen mit verschiedenen rekombinanten und nativen Fragmenten von BP180 wurde der Nachweis von zirkulierenden Autoantikörpern deutlich sensitiver. Das könnte bei Therapieentscheidungen und im Krankheitsverlauf hilfreich sein. Durch ergänzende Immunpräzipitationsuntersuchungen konnten bei 7 Patienten Antikörper gegen Laminin 5 gefunden werden, 5 davon zeigten ebenfalls BP180-Reaktivität. Insgesamt wird auch deutlich, daß beim SHP nach IgG- und IgA-Reaktivität gesucht werden sollte. Mit Blick auf die Feinspezifität der Autoantikörper stellt die Immundominanz des BP180 C-Terminus einen Unterschied zum BP dar und lässt Ähnlichkeiten der Pathogenese von SHP und LAD erkennen.

### **6 Zusammenfassung**

Das Schleimhautpemphigoid (SHP) ist eine chronische, subepidermal blasenbildende Autoimmundermatose des älteren Menschen mit überwiegendem Schleimhautbefall. Typischerweise lassen sich im Serum und in der Haut der Patienten Autoantikörper der IgG- und/ oder IgA- Klasse gegen Strukturproteine der dermo-epidermalen Junctionszone nachweisen. Am häufigsten sind diese Antikörper gegen das 180 kDa schweren bullöse Pemphigoid Autoantigen 2 (BP180) gerichtet, bei ca. 30% der Patienten findet sich Reaktivität gegen Laminin 5.

Ziel dieser Arbeit war es, die Autoantikörper im Serum von Patienten mit SHP näher zu charakterisieren. Dazu wurden 26 Seren von Patienten mit dem klinischen und immunfluoreszenzoptischen Bild des SHP mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie auf humaner Spalthaut, mittels Immunoblot mit nativen und rekombinanten Formen von BP180 und Typ VII Kollagen sowie mittels Immunpräzipitation radioaktiv markierter Keratinozyten auf Reaktivität gegen Laminin 5 untersucht.

In der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie auf humaner Spalthaut konnten in etwa der Hälfte der Fälle zirkulierende Autoantikörper im Serum der Patienten nachgewiesen werden. Durch den kombinierten Einsatz verschiedener Proteine im Immunoblot wurden in allen Seren, die nicht Antikörper gegen Laminin 5 enthielten, Autoantikörper gegen BP180 gefunden. Dabei zeigte sich, daß die IgA- und IgG- Immunglobulinklassen zu etwa gleichen Teilen vorhanden waren. Außerdem wurde eine immundominante Rolle der NC16A-Region und des C- Terminus innerhalb der Ektodomäne von BP180 nachgewiesen. In keinem der untersuchten Seren zeigten sich Antikörper gegen Typ VII Kollagen im Immunoblot mit einem dermalen Extrakt. Ergänzende Immunpräzipitationsuntersuchungen radioaktiv markierter Keratinozyten ergaben bei 7 Patienten Antikörper gegen Laminin 5, davon zeigten 5 Seren zusätzlich BP180-Reaktivität.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass durch die Kombination von verschiedenen Westernblotuntersuchungen unter Verwendung verschiedener rekombinanter und nativer Fragmente von BP180 sowie der Immunpräzipitation humaner Keratinozyten bei allen Patienten zirkulierende Autoantikörper nachgewiesen werden konnten. Darüber hinaus

verdeutlichen unsere Untersuchungen die Notwendigkeit beim Verdacht auf ein SHP nicht nur hinsichtlich IgG-, sondern auch hinsichtlich IgA-Autoantikörpern zu untersuchen.

## 7 Literaturverzeichnis

Ahmed AR, Kurgis BS and Rogers 3d RS (1991) Cicatricial pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 24:987-1001

Balding SD, Diaz LA, Giudice GJ (1997) A recombinant form of the human BP180 ectodomain forms a collagen-like homotrimeric complex. *Biochemistry* 36:8821-30

Balding SD, Prost C, Diaz LA, Bernard P, Bedane C, Aberdam D, Giudice GJ (1996) Cicatricial pemphigoid autoantibodies react with multiple sites on the BP180 extracellular domain. *J Invest Dermatol* 106:141-6

Basset-Sgiuen N, Caughman SW, Yancey KB (1990) A-431 cells and human keratinocytes synthesize and secrete the third component of complement. *J Invest Dermatol* 95:621-5

Bedane C, McMillan JR, Balding SD, Bernard P, Prost C, Bonnetblanc JM, Diaz LA, Eady RAJ, Giudice GJ (1997) Bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid autoantibodies react with ultrastructurally separable epitopes on the BP180 ectodomain: evidence that BP180 spans the lamina lucida. *J Invest Dermatol* 108:901-907

Bedane C, Prost C, Bernard P, Catanzano G, Bonnetblanc J-M, Dubertret L (1991) Cicatricial pemphigoid antigen differs from bullous pemphigoid antigen by its exclusive extracellular localization: A study by indirect immunoelectronmicroscopy. *J Invest Dermatol* 97:3-9

Bernard P, Prost C, Durepaire N, Basset-Seguin N, Didierjean L, Saurat JH (1992) The major cicatricial pemphigoid antigen is a 180-kD protein that shows immunologic cross-reactivities with the bullous pemphigoid antigen. *J Invest Dermatol* 99:174-9

Bernard P, Prost C, Lecerf V, et al (1990) Studies of cicatricial pemphigoid autoantibodies using direct immunoelectron microscopy and immunoblot analysis. *J Invest Dermatol* 94:630-635

Bernard P, Vaillant L, Labeille B, Bedane C, Arbeille B, Denoeux, J-P, Lorette G, Bonnetblanc J-M, Prost C (1995) Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin disease in three French regions. *Arch Dermatol* 31:48-52

Bhol KC, Goss L, Kumari S, Colon JE, Ahmed AR (2001) Autoantibodies to human alpha6 integrin in patients with oral pemphigoid. *J Dent Res* 80:1711-5

Boukamp P, Petrussevska RT, Bretikreuz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106:761-771

Bruckner-Tuderman L (1994) Collagen VII and bullous disorders of the skin. *Dermatology* 189:16-20

Bruckner-Tuderman L (1999) Hereditary skin diseases of anchoring fibrils. *J Dermatol Sci* 20:122-33

Caux FA, Giudice GJ, Diaz LA, Fairley JA (1996) Cicatricial pemphigoid. *J Geriatr Dermatol* 4:42-46

Chan LS, Ahmed AR, Anhalt GJ, Bernauer W, Cooper KD, Elder MJ, Fine JD, Foster CS, Ghohestani R, Hashimoto T, Hoang-Xuan T, Kirtschig G, Korman NJ, Lightman S, Lozada-Nur F, Marinkovich MP, Mondino BJ, Prost-Squarcioni C, Rogers RS 3rd, Setterfield JF, West DP, Wojnarowska F, Woodley DT, Yancey KB, Zillikens D, Zone JJ (2002) The first international consensus on mucous membrane pemphigoid. *Arch Dermatol* 138: 370-79

Chan LS, Vanderlugt CJ, Hashimoto T, Nishikawa T, Zone JJ, Black MM, Wojnarowska F, Stevens SR, Chen M, Fairley JA, Woodley DT, Miller SD, Gordon KB (1998) Epitope spreading: Lessons from autoimmune skin disease. *J Invest Dermatol* 2:103-109

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

Chen M, Marinkovich MP, Jones JC, O'Toole EA, Li YY, Woodley DT (1999) 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* 122:177-83

Civatte A (1943) Diagnostic histopathologique de la dermatite polymorph douloureuse ou maladie Duhring-Brocq. *Ann Derm Syph* 3:1-30

Civatte A (1949) Le diagnostic des dermatoses bulleuses au laboratoire. *Arch Belg Derm Syph* 5:273-275

Dantzig P (1973) Circulating antibodies in SHP. *Arch Dermatol* 108:264-266

Davis AL, Bhogal BS, Whitehead P, Frith P, Murdoch ME, Leigh IM, Wojnarowska F (1991) Lichen planus pemphigoides: its relationship to bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 125:263-71

Domloge-Hultsch N, Anhalt G, Gammon WR, et al (1994) Antiepiligrin cicatricial pemphigoid. A subepithelial bullous disorder. *Arch Dermatol* 130:1521-1529

Domloge-Hultsch N, Gammon WR, Briggaman RA, Gil SG, Carter WG, Yancey KB (1992) 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* 90:1628-33

Egan CA, Lazarova Z, Darling TN, Yee C, Cote T, Yancey KB (2001) Anti-epiligrin cicatricial pemphigoid and relative risk for cancer. *The Lancet* 357:1850-51

Gammon WR, Briggaman RA, Woodley DT, Healt PW, Wheeler CE (1984) Epidermolysis bullosa acquisita - a pemphigoid-like disease. *J Am Acad Dermatol* 11:820-832

Gammon WR, Murell DF, Jenison MW (1993) Autoantibodies to collagen VII recognize epitopes in a fibronectin- like region of the noncollagenous NC-1 domain. *J Invest Dermatol* 100:1618-23

Georgi M, Scheckenbach C, Kromminga A, Partscht K, Messer G, Bröcker EB, Zillikens D (2001) Mapping of epitopes on the BP180 ectodomain targeted by IgA and IgG autoantibodies in patients with the lamina lucida- type of linear IgA disease. *Arch Dermatol Res* 293:109-114

Ghohestani RF, Nicolas JF, Kanitakis L, Claudy A (1997) Linear IgA bullous dermatosis with IgA antibodies exclusively directed against the 180- or 230-kDa epidermal antigens. *J Invest Dermatol.* 108:854-8

Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA (1992) Cloning and Primary Strucural Analysis of the Bullous Pemphigoid Autoantigen BP180. *J Invest Dermatol* 99:243-250

Giudice GJ, Emery DJ, Zelickson BD, Anhalt GJ, Liu Z, Diaz LA (1993) Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Immunol* 151:5742-5720

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

Hirako Y, Nishizawa Y, Sitaru C, Opitz A, Marcus K, Meyer HE, Butt E, Owaribe K, Zillikens D (2003) The 97-kDa (LABD97) and 120-kDa (LAD-1) fragments of bullous pemphigoid antigen 180/type XVII collagen have different N-termini. *J Invest Dermatol.* 121:1554-6

Kawahara Y, Amagai M, Ohata Y, Ishii K, Hasegawa Y, Hsu R, Yee C, Yancey KB, Nishikawa T (1998) A case of cicatricial pemphigoid with simultaneous IgG autoantibodies against the 180 kd bullous pemphigoid antigen and laminin 5. *J Am Acad Dermatol* 38:624-7

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

Kromminga A, Sitaru C, Meyer J, Arndt R, Schmidt E, Christophers E, Brocker EB, Zillikens D (2002) Cicatricial pemphigoid differs from bullous pemphigoid and pemphigoid gestationis regarding the fine specificity of autoantibodies to the BP180 NC16A domain. *J Dermatol Sci* 28:68-75

Kromminga A, Scheckenbach C, Georgi M, Hagel C, Arndt R, Christophers E, Zillikens D (2000) Patients with bullous pemphigoid and linear IgA disease show a dual IgA and IgG autoimmun response to BP180. *J Autoimmun* 15:293-300

Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, Mutasim DF, Diaz LA (1986) Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. *J Immunol* 136:1231-35

Lascaris G, Sklavenounou A, Stratigos J (1982) Bullous pemphigoid, cicatricial pemphigoid, and pemphigus vulgaris. A comparative clinical survey of 278 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 54:656-62

Lazarova Z, Hsu R, Yee C, Yancey KB (2000) Human anti-laminin 5 autoantibodies induce subepidermal blisters in an experimental human skin graft model. *J Invest Dermatol* 114:178-84

Lever WF (1951) Pemphigus: A histopathologic study. *Arch Derm* 64:727-753

Leverkus M, Schmidt E, Lazarova Z, Bröcker EB, Yancey KB, Zillikens D (1999) Antiepiligrin cicatricial pemphigoid: an underdiagnosed entity within the spectrum of scarring autoimmune subepidermal bullous diseases? *Arch Dermatol* 135:1091-8

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

Liu Z, Giudice GJ, Swartz SJ, Fairley JA, Till GO, Troy JL, Diaz LA (1995) The role of complement in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 95:1539-1544

Liu Z, Giudice GJ, Zhou X, Swartz SJ, Troy JL, Fairley JA, Till GO, Diaz LA (1997) A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 100:1256-1263

Matsushima S, Horiguchi Y, Honda T, Fujii S, Okano T, Tanabe M, Wakayama T, Hashimoto T, Yancey KB (2004) A case of anti-epiligrin cicatricial pemphigoid associated with lung carcinoma and severe laryngeal stenosis: review of Japanese cases and evaluation of risk for internal malignancy. *J Dermatol* 31:10-5

Marinkovich MP, Taylor TB, Keene DR, Burgeson RE, Zone JJ (1996) LAD-1, the linear IgA bullous dermatosis autoantigen, is a novel 120-kDa anchoring filament protein synthesized by epidermal cells. *J Invest Dermatol* 106: 734-738

Morrison LH, Labib RS, Zone JJ, Diaz LA, Anhalt GJ (1988) Herpes gestationis autoantibodies recognize a 180-kD human epidermal antigen. *J Clin Invest* 81(6):2023-2026

Mulyowa GK, Jaeger G, Sitaru C, Bröcker EB, Zillikens D, Schmidt E (2006) Scarring autoimmune bullous disease in a Ugandan patient with autoantibodies to BP180, BP230, and laminin 5. *J Am Acad Dermatol* 54:43-46

Murakami H, Hashimoto T, Bhogal BS, Black MM, Zillikens D, Yancey KB, Giudice GJ, Diaz LA, Nishikawa T (1998) Analysis of cicatricial pemphigoid antigens. *J Dermatol Sci* 17:39-44

Mutasim DF (2004) Management of autoimmune bullous diseases: Pharmacology and therapeutics. *J Am Acad Dermatol* 51:859-77

Nie Z, Hashimoto T (1999) IgA antibodies of cicatricial pemphigoid sera specifically react with C-terminus of BP180. *J Invest Dermatol* 112:254-5

Nonaka S, Ishiko A, Masunaga T, Akiyama M, Owaribe K, Shimizu H, Nishikawa T (2000) The extracellular domain of BPAG2 has a loop structure in the carboxy terminal flexible tail in vivo. *J Invest Dermatol* 115:889-92.

Pas HH, Kloosterhuis GJ, Heeres K, van der Meer JB, Jonkman MF (1997) Bullous pemphigoid and linear IgA dermatosis sera recognize a similar 120-kDa keratinocyte collagenous glycoprotein with antigenic cross-reactivity to BP180. *J Invest Dermatol* 108:423-29

Reddy D, Muller P, Tran H, Nguyn N, Schaecke H, Bruckner-Tuderman L, Giudice G, Marinkovich P (1998) The extracellular domain of BP180 binds laminin 5. *J Invest Dermatol* 110:593 (Abstract)

Roh JY, Yee C, Lazarova Z, Hall RP, Yancey KB (2000) The 120-kDa soluble ectodomain of type XVII collagen is recognized by autoantibodies in patients with pemphigoid and linear IgA dermatosis. *Br J Dermatol* 143:104-11

Rosenbaum MM, Esterly NB, Greenwald MJ, Gerson CR (1984) Cicatricial pemphigoid in a 6 year-old child, report of a case and review of literature. *Pediatr Dermatol* 2:13-22

Schäcke H, Schumann H, Hammami-Hausli N, Raghunat M, and Bruckner-Tuderman L (1998) Two forms of collagen XVII in keratinocytes. A full-length transmembrane protein and a soluble ectodomain. *J Biol Chem* 273:25937-943

Schmidt E et Zillikens D (2000) Autoimmune and inherited subepidermal blistering diseases: advances in the clinic and the laboratory. *Adv Dermatol* 16:113-57

Schmidt E, Reimer S, Kruse N, Jainta S, Brocker EB, Marinkovich MP, Giudice GJ, Zillikens D (2000) Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 115:842-8

Schumann H, Baetge J, Tasanen K, Wojnarowska F, Schäcke H, Zillikens D, Bruckner-Tudermann L (2000) The shed ectodomain of collagen XVII/BP180 is targeted by autoantibodies in different blistering skin diseases. *Am J Path* 156:685-695

Shimizu H, Masunaga T, Ishiko A, Matsumura K, Hashimoto T, Nishikawa T, Domloge-Hultsch N, Lazarova Z, Yancey KB (1995) Autoantibodies from patients with cicatricial pemphigoid target different sites in epidermal basement membrane. *J Invest Dermatol* 104:370-373

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

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

Tamada Y, Yokochi K, Nitta Y, Ikeya T, Hara K, Owaribe K (1995) Lichen planus pemphigoides: identification of 180 kd hemidesmosome antigen. *J Am Acad Dermatol* 32:883-7

Tyagi S, Bhol K, Natarajan K, Livir-Rallatos C, Foster CS, Ahmed AR (1996) Ocular cicatricial pemphigoid antigen: partial sequence and biochemical characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14714-19

Vanderlugt CL, Miller SD (2002) Epitop spreading in immunmediated diseases: Implication for immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2:85-95

Wichmann JE (1794) Ideen zur Diagnostik: Beobachtenden Aerzten mitgeteilt. Hannover, Germany, Helwing 89,vol.1

Woodley DT, Briggaman RA, O'Keefe EJ, Inman AO, Queen LL, Gammon WR (1984) Identification of the skin basement-membran autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. *N Engl J Med* 310:1007-13

Yancey KB (2003) Cicatricial Pemphigoid. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB, editors. *Dermatology in General Medicine*. 6th edn. New York: McGraw-Hill, Inc. pp. 581-86

Zillikens D, Wever S, Roth A, Weidenthaler-Barth B, Hashimoto T, Bröcker EB (1995) Incidence of autoimmune subepidermal blistering dermatoses in a region of central germany. *Arch Dermatol* 131:957-958

Zillikens D, Kawahara Y, Ishiko A, Shimizu H, Mayer J, Rank CV, Liu Z, Giudice GJ, Tran HH, Marinkovich MP, Bröcker EB, Hashimoto T (1996) A novel subepidermal

blistering disease with autoantibodies to a 200- kDa antigen of the basement membrane zone. *J Invest Dermatol* 106:1333-38

Zillikens D, Rose PA, Balding SD, Liu Z, Olague-Marchan M, Diaz LA, Giudice GJ (1997a) Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. *J Invest Dermatol* 109:573-9

Zillikens D, Mascaro JM, Rose PA, Liu Z, Ewing SM, Caux F, Hoffmann RG, Diaz LA, Giudice GJ (1997b) A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 109: 679-83

Zillikens D, Caux F, Mascaro JM, Wesselmann U, Schmidt E, Prost C, Callen JP, Bröcker EB, Diaz LA, Giudice GJ (1999a) Autoantibodies in lichen planus pemphigoides react with a novel epitope within the C-terminal NC16A domain of BP180. *J Invest Dermatol* 113:117-21

Zillikens D, Herzele K, Georgi M, Schmidt E, Chimanovitch I, Schumann H, Mascaro JM Jr., Diaz LA, Bruckner-Tudermann L, Bröcker EB, Giudice GJ (1999b) Autoantibodies in a subgroup of patients with linear IgA disease react with the NC16A domain of BP180. *J Invest Dermatol* 113:947-53

Zone JJ, Taylor TB, Kadunce DP, Meyer LJ (1990) Identification of the cutaneous basement membrane zone antigen and isolation of antibody in linear immunoglobulin A bullous dermatosis. *J Clin Invest* 85:812-820

Zone JJ, Taylor TB, Meyer LJ, Petersen MJ (1998) The 97 kDa linear IgA bullous disease antigen is identical to a portion of the extracellular domain of the 180 kDa bullous pemphigoid antigen, BPAg2. *J Invest Dermatol* 110:207-210

## 8 Anhang

### 8.1 Verzeichnis wichtiger Abkürzungen

AEBSF	Aminoethylbenzensufonylfluorid
BP	Bullöses Pemphigoid
BSA	Rinderserumalbumin
C- Terminus/terminal	Carboxy- Terminus/terminal
SHP	Vernarbendes Pemphigoid (cicatricial Pemphigoid)
DE	dermales Extrakt
DEJ	dermoepidermale Junktionszone
DTT	Dithiotheitol
DIF	direkte Immunfluoreszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
ECL	enhanced chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FITC	Fluoreszein- Isothiocyanat
GST	Glutathion- S- Transferase
HCl	Salzsäure
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
Ig	Immunglobulin
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
IPTG	Isopropyl- $\beta$ - D- Thiogalactopyranosid
KC-E	Keratinocyten-Extrakt
kDa	Kilodalton
LAD	lineare IgA Dermatose
LAD-1	lineare IgA Dermatose Antigen 1 (entspricht der löslichen BP180 Ektodomäne)
LPP	Lichen planus pemphigoides
N- Terminus/terminal	Amino-Terminus/terminal
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge

NC	nicht-kollagen
PBS	phosphate-buffered saline
PG	Pemphigoid gestationis
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline plus Tween
U/min.	Umdrehung pro Minute

## **8.2 Danksagung**

Prof. Dr. med. Detlef Zillikens bin ich zu großem Dank verpflichtet für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die fachkundige Unterstützung während meiner Zeit im Labor und darüber hinaus.

Prof. Dr. med. Eva-B. Bröcker danke ich für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit an der Universität- Hautklinik Würzburg durchzuführen.

Bei Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Enno Schmidt bedanke ich mich für die Vorbereitung der Veröffentlichung und das Einbringen seiner Erfahrung auf dem Gebiet der Proteinchemie und Autoimmunbiologie.

Frau Kathrin Müller- Blech, Würzburg, danke ich für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Bei meinen Kommilitonen Christian Scheckenbach und Dr. med. Matthias Georgi bedanke ich mich besonders für die Einführung in die Methoden im Labor und die Beantwortung vieler Fragen. Außerdem für die geleistete Vorarbeit, ohne die diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Prof. Dr. Takashi Hashimoto und Dr. Zhuxiang Nie, beide Fukuoka, Japan, haben uns freundlicherweise die bakteriellen Klone für die Fusionsproteine GST- 1050, -963 und -915 zur Verfügung gestellt. Prof. Dr. Norbert Fusenig, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, bin ich dankbar für die Bereitstellung der Keratinozyten-Tumorzelllinie HaCaT. Priv.-Doz. Dr. Gerald Messer und Dr. Karin Partscht, München, danke ich für die Bereitstellung einiger Patientenseren samt der dazugehörigen klinischen Informationen. Besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Kim Yancey für die Untersuchung unserer Seren auf Reaktivität gegen Laminin 5 durch Immunpräzipitation radioaktiv markierter Keratinozyten.

### 8.3 Lebenslauf

Geboren: 03.01.1975 in Worms

Vater: Dr. med. Wulf Skrobek, Facharzt für Anästhesie

Mutter: Ilka Skrobek, geb. Heidrich, Apothekerin

Verheiratet mit Dr. med. Heidi Beland

Gemeinsame Tochter: Anna Claudia Skrobek, geb. am 3.12.2006

#### Schulbildung

1981 – 1985	Gustav-Walle-Grundschule, Würzburg
1985 – 1994	Röntgen-Gymnasium, Würzburg, Neusprachlicher Zweig
1.7.1994	Abitur in den Fächern Physik, Wirtschaft- und Rechtslehre, Englisch und Geschichte

#### Hochschulbildung

01.11.1995-	Studium der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität
22.05.2002	Würzburg
August 1997	Physikum
August 1998	1. Staatsexamen
März 2001	2. Staatsexamen
April 2001- März 2002	Praktisches Jahr in Sarnen, Schweiz, Schweinfurt und Würzburg
Mai 2002	3. Staatsexamen

#### Beruflicher Werdegang

August 2002 –	Arzt im Praktikum an der Klinik für Allgemein-, Viszeral-,
Januar 2004	Gefäß- und Thoraxchirurgie Klinikum Konstanz
Februar 2004	Vollapprobation
Februar 2004 –	Assistenzarzt an der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und
Dezember 2005	Thoraxchirurgie des Klinikums Konstanz (Chefarzt Prof. Dr. H.B. Reith)

Januar 2006 – Assistenzarzt an der Klinik für Unfall-, Plastische-,  
Dezember 2006 Wiederherstellungs- und Handchirurgie des Klinikums Konstanz  
(Chefarzt Prof. Dr. M. Runkel)

Seit Januar 2007 Assistenzarzt an der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und  
Thoraxchirurgie des Klinikums Konstanz (Chefarzt Prof. Dr. H.B.  
Reith)

---

## **Eigene Veröffentlichungen**

Auszüge dieser Arbeit wurden in folgenden Originalarbeiten veröffentlicht:

Schmidt E, Skrobek C, Kromminga A, Hashimoto T, Messer G, Bröcker EB, Yancey KB, Zillikens D (2001) Cicatricial pemphigoid: IgA and IgG autoantibodies target epitopes on both intra- and extracellular domains of pemphigoid antigen 180. Br J Dermatol 145:778-783

Chimanovitch I, Skrobek C, Rose C, Nie Z, Hashimoto T, Bröcker EB, Zillikens D (2002) Pemphigoid gestationis with predominant involvement of oral mucous membran and IgA autoantibodies targeting the C- Terminus of BP180. J Am Acad Dermatol 47:780-784

Schachter M, Brieva JC, Jones JC, Zillikens D, Skrobek C, Chan LS (2001) Pemphigoid nodularis associated with autoantibodies to the NC16A domain of BP180 and a hyperproliferative integrin profile. J Am Acad Dermatol 45:747-754

Geyer AS, Zillikens D, Skrobek C, Cohen B, Anhalt GJ, Nousari HC (2003) Vesicular pemphigoid in a 16-year-old boy. J Am Acad Dermatol 49:722-724

Abstracts:

Schmidt E, Skrobek C, Kromminga A, Hashimoto T, Messer G, Bröcker E-B, Yancey KB, Zillikens D (2001) Cicatricial pemphigoid: IgA and IgG autoantibodies target epitopes on both intra- and extracellular domains of BP180. 28. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung 15.-17.02.2001, München, Arch Dermatol Res 293: 36