

**Aus der Klinik und Poliklinik
für Haut- und Geschlechtskrankheiten
der Universität Würzburg
Direktorin: Prof. Dr. med. Eva-B. Bröcker**

**Untersuchung zur Spezifität von Autoantikörpern bei
Patienten mit linearer IgA Dermatose**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius Maximilians-Universität zu Würzburg

**vorgelegt von
Karin Herzele
aus Augsburg**

Würzburg, im September 2001

Referent: Professor Dr. med. Detlef Zillikens

Korreferentin: Professor Dr. med. Eva-B. Bröcker

Dekan: Professor Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Promovendin ist Ärztin.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1-5
1.1.	Klinisches Bild	1
1.2.	Immunhistologie	1-2
1.3.	Immunelektronenmikroskopie	2
1.4.	Zielantigene	2-3
1.5.	BP180, LAD-1 und BP180 NC16A	3-5
2.	FRAGESTELLUNG	6
3.	MATERIAL UND METHODEN	7-15
3.1.	Patientenseren	7
3.2.	Direkte Immunfluoreszenz	7-8
3.3.	Indirekte Immunfluoreszenz	8
3.4.	Herstellung von rekombinantem humanem GST-BP180 NC16A und GST	8-9
3.5.	Affinitätsaufreinigung der Proteine	9-10
3.6.	Bestimmung der Proteinkonzentration	10-11
3.6.1.	Bio Rad Protein Assay	10-11
3.6.2.	OD 280-Bestimmung	11
3.6.3.	Coomassie-Färbung des Gels	11
3.7.	SDS-PAGE und Immunoblot	11-15
4.	RESULTATE	16-21
4.1.	Überprüfung der Spezifität des Peroxidase konjugierten Kaninchen Anti-Human IgA-Antikörpers	16
4.2.	Bestimmung der relativen Sensitivität des Peroxidase konjugierten Kaninchen Anti-Human IgA-Antikörpers	16
4.3.	Vergleich der Entwicklungsmethode ECL mit DAB	17
4.4.	Eine Untergruppe von LAD-Patienten zeigt Reaktivität mit BP180 NC16A1-5	18-21
5.	DISKUSSION	22-27
5.1.	BP180 als Zielantigen bei verschiedenen klinischen Varianten blasenbildender Erkrankungen	22

5.2.	Biosynthetische Beziehung zwischen BP180, LAD-1 und BP180 NC16A	22-23
5.3.	Welche Rolle spielt BP180 NC16A als Zielantigen?	23-24
5.4.	Heterogenes Erkennungsmuster von Autoantigenen bei LAD-Patienten	24-26
5.5.	Gibt es Unterschiede im klinischen Bild bei der gegen BP180 NC16A reagierenden LAD-Untergruppe?	26-27
6.	SCHLUSSFOLGERUNG	28
7.	ZUSAMMENFASSUNG	29
8.	LITERATURVERZEICHNIS	30-39
9.	ANHANG	40-42
9.1.	Tabelle aller LAD-Seren	40-41
9.2.	Tabelle aller DH-Seren	42
9.3.	Mitarbeit zu folgenden Publikationen	43

1.1. EINLEITUNG

1.1. Klinisches Bild

Die lineare IgA Dermato­se (LAD) ist eine blasenbildende Autoimmunerkrankung, die durch subepidermale Blasen und lineare IgA-Ablagerungen an der kutanen Basalmembranzzone (BMZ) charakterisiert ist (Chorzelski und Jablonska, 1979). Es gibt zwei Gruppen der linearen IgA Dermato­se, die klinisch voneinander abzugrenzen sind: 1) die lineare IgA Dermato­se des Erwachsenenalters und 2) die lineare IgA Dermato­se des Kindesalters, auch CBDC (chronic bullous disease of childhood) genannt.

Die CBDC ist charakterisiert durch die Prädominanz von Eruptionen an Stamm, Leiste, im Bereich von Pelvis, Perineum und auch perioral. Es treten sowohl in Gruppen stehende oder auch anulär angeordnete gefüllte Vesikel als auch Blasen auf. Bei der LAD des Erwachsenenalters findet man gehäuft gruppierte Papulovesikel an den Streckseiten, die den Läsionen der Dermatitis Herpetiformis Duhring (DH) oder auch denen des bullösen Pemphigoid (BP) ähneln können (Peters et al, 1989; Wojnarowska et al, 1988; Chorzelski et al, 1979; Marsden et al, 1980; Hwang et al, 1985). Es gibt LAD-Patienten, deren Blasen ohne Narben abheilen und deren Erkrankung eine gute Prognose hat. Andere dagegen zeigen einen Befall der Schleimhaut, v. a. auch der Konjunktiva (Wojnarowska et al, 1988; Aultbrinker et al; 1988; Leonard et al, 1984). Läsionen der Mundschleimhaut und der Konjunktiven können unter starker Narbenbildung abheilen (Wojnarowksa et al, 1988). Differentialdiagnostisch sind beim vernarbenden Phänotyp v.a. das vernarbende Pemphigoid (CP) und die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) (Zillikens et al, 1994) abzugrenzen. Die Prognose der LAD anhand des klinischen Bildes und die Abgrenzung zu anderen blasenbildenden Erkrankungen ist jedoch oft schwierig (Peters et al, 1989).

1.2. Immunhistologie

Histologisch und immunhistologisch finden sich lineare IgA-Ablagerungen an der Basalmembranzzone mit einer Prädominanz von Neutrophilen in den dermalen Papillen wie bei DH, mitunter auch eine Anreicherung von Eosinophilen wie bei BP (Dabrowski et al, 1979; Darling et al, 1995; Blenkinopp et al, 1983). Die Abgrenzung zu anderen

bullösen Erkrankungen erfolgt durch den Nachweis von zirkulierenden IgA-Autoantikörpern in der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) auf Natriumchlorid (NaCl)-separierter humaner Spalthaut (Willsteed et al, 1990) oder in der direkten Immunfluoreszenz (DIF) auf periläsionaler Haut. Zusätzlich weisen einige Patienten in der DIF auch Ablagerungen von IgG und C3 auf (Peters et al, 1989; Leonard et al, 1982; Wilson et al, 1985; Faber et al, 1973; Marsden et al, 1980). Zone und Mitarbeiter (1994) schlugen für diese Patienten die Bezeichnung „linear IgA/IgG bullous dermatosis“ vor.

1.3. Immunelektronenmikroskopie

Immunelektronenmikroskopische Studien haben gezeigt, daß es offensichtlich eine Heterogenität der Autoimmunantwort bei LAD-Patienten gibt. Einige LAD-Patientenseren zeigen IgA-Ablagerungen innerhalb der Lamina lucida, andere erkennen die Sublamina densa-Region, und wiederum andere weisen Ablagerungen in beiden Lokalisationen auf (Yaoita und Katz, 1977; Bhogal et al, 1987; Prost et al, 1989; Karpati et al, 1992; Ishiko et al, 1996; Dabrowski et al, 1979).

1.4. Zielantigene

Es wurden viele Zielantigene beschrieben, die mit der linearen IgA Dermatoase assoziiert sind. Die Mehrzahl der LAD-Seren bindet an ein epidermales Antigen. Eine Minderheit von ca. 20 % erkennt allerdings ein dermales Antigen (Wojnarowska et al, 1995). Es wurde berichtet, daß diese LAD-Seren mit einem 255 kDa Polypeptid aus dermalem Extrakt reagieren (Dmochowski et al, 1993). Eine weitere Autoantikörpergruppe der dermal bindenden Seren stellt Typ VII Kollagen dar, das Autoantigen der EBA und die hauptsächliche Komponente der Ankerfibrillen (Zambruno et al, 1994; Hashimoto et al, 1996; Allen et al, 1997; Caux et al, 1997; Wakelin et al, 1998; Rusenko et al, 1989; Sakai et al, 1986). Wojnarowska et al. (1991 und 1994) berichteten über die Reaktivität von LAD-Seren mit einem dermalen 285 kDa Protein, das bislang jedoch nicht weiter charakterisiert wurde. Zone et al. konnten als erste zeigen, daß IgA-Antikörper des Lamina lucida-Typ der adulten und juvenilen Form der LAD mit einem 97 kDa Protein

(LABD 97) aus epidermalen Extrakten reagieren (Zone et al, 1990 und 1996; Dmochowski et al, 1993). Marinkovich et al. (1996) zeigten, daß LAD-Seren, wie der monoklonale Antikörper 123, ein 120 kDa Protein erkennen, das von kultivierten Keratinozyten in den Zellkulturüberstand sezerniert wird. In letzter Zeit häuften sich Berichte, daß Antikörper von LAD-Patienten auch das BP180 und BP230 Protein erkennen (Ghohestani et al, 1997; Zone et al, 1994).

1.5. BP180, LAD-1 und BP180 NC16A

BP180, auch bekannt als BP Antigen 2 oder Typ XVII Kollagen wurde zunächst als das Hauptantigen von IgG-Antikörpern bei Patienten mit bullösem Pemphigoid, einer weiteren Erkrankung mit subepidermaler Blasenbildung, beschrieben. Diese Erkrankung weist als Charakteristikum lineare IgG-Ablagerungen an der Dermo-epidermalen Junctionszone (DEJ) auf (Labib et al, 1986; Diaz et al, 1990; Giudice et al, 1992). BP180 ist ein transmembranöses Glykoprotein der basalen Keratinozyten (BK) mit einer Typ II Ausrichtung, d.h. seine amino-terminale (NH₂) Domäne liegt im Zytoplasma, während die carboxy-terminale (COOH) Domäne in den extrazellulären Raum reicht und die Lamina lucida der DEJ überbrückt (Zillikens und Giudice, 1998). Die amino-terminale NC16C Domäne ist im Zytoplasma lokalisiert. Daran schließt die transmembranöse Domäne (NC16B) an. Rotary Shadowing Analysen zeigten, daß der zytoplasmatische Teil des BP180 Moleküls zusammen mit der transmembranösen Domäne die Form eines globulären Kopfes hat. Der transmembranösen Domäne folgt C-terminal die aus einer kollagen-ähnlichen Tripelhelix bestehende extrazelluläre Domäne. Unmittelbar an der Zytoplasmamembran befindet sich die NC16A Domäne, der ein aus 15 kollagenen Domänen (**Abbildung 1**, schwarze Box) bestehender Teil folgt. Die NC16A Domäne bildet zusammen mit der 15. kollagenen Domäne einen rigiden Stab. Die restlichen 14 kollagenösen Abschnitte sind von nicht-kollagenösen Abschnitten unterbrochen und formen einen flexiblen Schwanz. Mit seinem C-terminalen Anteil reicht dieser in die Lamina densa der DEJ (Hirako et al, 1996 und 1998; Balding et al, 1997; Bedane et al, 1997; Masunaga et al, 1997).

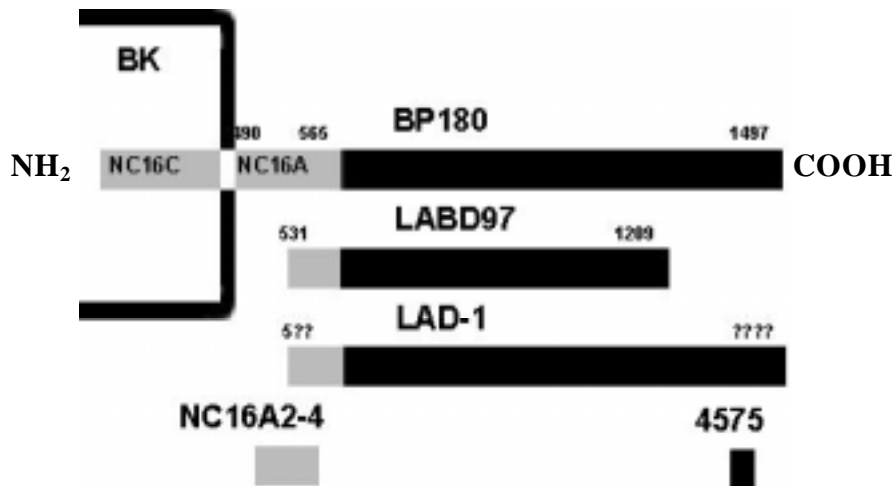


Abbildung 1: Schematische Darstellung des BP180, des epidermalen 97 kDa Antigen (LABD 97) und des von Keratinozyten stammenden 120 kDa Protein.

BP180 ist ein transmembranäres Protein basaler Keratinozyten (BK, basaler Keratinozyt) mit einer großen Ektodomäne aus 15 kollagenen Domänen (schwarze Box). Die große nicht-kollagene extrazelluläre Domäne (NC16A) schließt sich der transmembranären Domäne (NC16B) an. Die amino-terminale NC16C Domäne ist im Zytoplasma lokalisiert. Die Aminosäurenummern stehen jeweils über den Boxen. Der Amino-Terminus von LABD97, wie von Zonet al (1998) sequenziert, folgt 42 Aminosäurenummern abwärts der transmembranären Domäne [innerhalb der Region 3 von NC16A, (Zillikens et al, 1997)]. Anscheinend fehlen ihm auch 288 Aminosäuren des C-Terminus von BP180. Bisher ist weder der N- noch der C-Terminus für das 120 kDa LAD-1 Antigen exakt definiert. Man nimmt an, daß der N-Terminus direkt am oder in der Nähe des N-Terminus von LABD97 lokalisiert ist. Der LAD-1 C-Terminus ist eventuell der gleiche wie der des BP180 Proteins in seiner vollen Länge.

In einem passiven Transfer-Mausmodell konnte gezeigt werden, daß Antikörper gegen BP180 eine subepidermale Blasenbildung hervorrufen, die durch Komplement vermittelt wird (Liu et al, 1993, 1995). Biochemischen Untersuchungen und Peptidsequenzanalysen zufolge scheinen LABD 97 und LAD-1 proteolytische Spaltprodukte der extrazelluläre Domäne von BP180 darzustellen. Das 97 kDa Protein wurde in Extrakten humaner Haut und das 120 kDa Protein in konditioniertem Medium von Zellen einer *Squamous Carcinoma Cell Line* (Plattenepithelkarzinomlinie) gefunden (Marinkovich et al, 1992 und 1996). Derzeit wird davon ausgegangen, daß LABD97 eine degradierte Form von LAD-1 darstellt (Marinkovich et al, 1992 und 1996; Zonet al, 1998; Pas et al, 1997; Schäcke et al, 1998; Hirako et al, 1998).

BP-Seren erkennen innerhalb der BP180-Ektodomäne v.a. vier verschiedene Epitope innerhalb der NC16A Domäne (MCW-0, MCW-1, MCW-2 und MCW-3). Diese Epitope liegen eng aneinandergereiht innerhalb der N-terminalen 45 Aminosäuren von NC16A (Guidice et al, 1993; Zillikens et al, 1997). Unter Verwendung von rekombinanten Formen des NC16A wurden sensitive und spezifische Untersuchungssysteme für den Nachweis von Antikörpern gegen BP180 entwickelt (Matsumura et al, 1996; Zillikens et al, 1997; Haase et al, 1998). Zusätzlich konnte die Reaktivität von BP-Seren mit anderen intra- und extrazellulären Epitopen des BP180 nachgewiesen werden (Murakami et al, 1998; Egan et al, 1999; Nie und Hashimoto, 1999; Perriard et al, 1999; Kromminga et al, 2000).

2. FRAGESTELLUNG

Die vorliegende Arbeit geht der Frage nach, ob Autoantikörper der linearen IgA Dermatose mit der immundominanten NC16A Domäne von BP180 reagieren. Unsere Hypothese war, daß alle oder zumindest ein Teil der Patienten die NC16A Domäne erkennen. Weiter interessierte uns, ob es zwischen LAD-Patienten, die die NC16A Domäne erkennen und solchen, die sie nicht erkennen, hinsichtlich Alter, Geschlecht und der Bildung von IgG-Antikörpern zusätzlich zu IgA-Antikörpern Unterschiede gibt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Patientenserum

In dieser Arbeit wurden die Seren von 50 Patienten mit linearer IgA Dermatose untersucht. 41 Seren stammten von Erwachsenen, 7 stammten von Kindern und zwei von Jugendlichen. Die Seren der Kinder und Jugendlichen rechneten wir zur Gruppe der CBDC. Ein großer Teil der Seren wurde uns freundlicherweise aus Forschungslabors aus dem In- und Ausland zur Verfügung gestellt.

Der Goldstandard für die Diagnose der LAD war der Nachweis von linearen IgA-Ablagerungen an der DEJ in der direkten Immunfluoreszenz auf periläsionaler Haut. Zusätzlich wurden alle Seren auch auf Reaktivität in der indirekten Immunfluoreszenz mit 1M NaCl-separierter Spalthaut untersucht, wobei nur solche Seren in die Studie aufgenommen wurden, die an der epidermalen Seite des Spaltes banden (Gammon et al, 1984, Zillikens et al, 1996). Zur Serumgewinnung wurden die Blutproben bei 3.000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgenommen, aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Als Kontrollen verwendeten wir 16 gut charakterisierte Seren von Patienten mit Dermatitis herpetiformis. Diese Seren enthielten IgA-Antikörper, die an Endomysium von Affenösophagus banden (Rose et al, 1999). Als Negativkontrollen dienten uns 50 Seren von gesunden Freiwilligen.

3.2. Direkte Immunfluoreszenz

Die direkte Immunfluoreszenz wurde an Biopsien periläsionaler Haut durchgeführt. Die frisch entnommene unfixierte Biopsie wurde direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Verarbeitung wurden 6 μm dicke Schnitte mit dem Kryostat bei -25°C gefertigt. Die Schnitte wurden auf Super Frost Plus Adhäsionsobjektträgern [15 min Beschichtungszeit, (Menzel, Deutschland)] aufgefangen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 10 min in Aceton fixiert und für 30 min luftgetrocknet. Daraufhin wurden die Objektträger mit Fluoreszenzfarbstoff [Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) (Sanofi, Freiburg)] konjugiertem Anti-Human IgG, IgA, C3 beschichtet. Der Antikörper wurde dazu mit phosphat buffered saline (PBS) [7,75 mM Na_2HPO_4 , 1,16 mM NaH_2PO_4 (Merck, Darmstadt),

0,15 M NaCl, in Aqua destillata, pH 7,2] im Verhältnis 1:100 verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei Raumtemperatur (RT) und Lichtschutz wurden die Schnitte 2×10 min lang in PBS gewaschen und danach mit einer Lösung aus Glycerin in PBS (1:5) eingedeckt. Die so gefärbten Schnitte periläsionaler Haut wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (Firma Leitz Wetzlar, Modell Laborlux S) beurteilt.

3.3. Indirekte Immunfluoreszenz

Als Spalthaut für die IIF wurde menschliche Haut von der Fußsohle oder Unterarmstreckseite verwendet. Die Haut wurde in 1 cm² große Stücke geschnitten und in 1 M NaCl Lösung ca. 5 h lang eingelegt. Wenn sich eine Spaltbildung zeigte, wurden 6 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt, über Nacht getrocknet, am nächsten Tag 10 min lang in Aceton gelegt und dann luftgetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte mit verdünntem Serum (1:10 in PBS, pH 7.2) 30 min lang bei 37°C inkubiert, daraufhin 2×10 min mit PBS Puffer (pH 7.2) gewaschen und mit FITC-konjugiertem Anti-Humanglobulin Antikörper vom Kaninchen [Verdünnung 1:100 in PBS (Sanofi, Freiburg), pH 7.2] nochmals für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die Schnitte mit Glycerin PBS (1:5) eingedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

3.4. Herstellung von rekombinantem humanem GST-BP180 NC16A1-5 und GST

In dieser Arbeit wurde kürzlich hergestelltes Glutathion S-Transferase (GST) Fusionsprotein verwendet, das die volle Länge der BP180NC16A Domäne GST-NC16A1-5 enthält (Zillikens et al, 1997).

Zur Präparation der bakteriellen Primärkultur der Klone mit rekombinantem GST und GST-NC16A benutzten wir bei -80°C gelagerte plasmidtragende *Escherichia coli* DH5α. Der jeweilige Klon wurde in 20 ml autoklaviertem Luria Bertani nach Miller (LBM)-Medium [1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt (Difco Laboratories, Detroit, USA), 0,15 M NaCl (Merck, Darmstadt) in Aqua destillata, pH 7,5] gelöst und bis zu einer Endkonzentration von 50µg/ml mit steril filtriertem Ampicillin (Sigma, St. Louis, USA)

versetzt. Diese Primärkultur wurde auf dem konzentralen Schüttler mit 220 U/min bei 37 °C über Nacht inkubiert. Danach wurde die Primärkultur im Verhältnis von 1:25 in (auf Inkubationstemperatur vorgewärmtem) LBM-Medium verdünnt und Ampicillin bis zur Endkonzentration von 50 µg/ml hinzugefügt. Die so entstandene Sekundärkultur wurde erneut bei 37°C und 220 U/min inkubiert. Nach ca. 2,5 - 3 h wurde die Bakteriendichte mit Hilfe eines Spektralphotometers bei OD 600 gegen den Eichwert von LBM-Medium bestimmt (Spektralphotometer der Firma Zeiss, Modell PMQ 3, Jena). Sobald die Extinktionswerte 0,5 - 0,6 erreichten, wurde der Sekundärkultur 2 ml Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) (Sigma) in einer Endkonzentration 0,5 mM zur Induktion der Proteinsynthese zugegeben. Nach erneuter Inkubation bei 37°C und 220 U/min über 4 h wurde die Kultur bei 4°C und 6.000 U/min für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Bodensatz wurde in Extraktionspuffer bei 4°C (auf Eis) resuspendiert. Dieser Extraktionspuffer bestand aus 5 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 0,05 mg/ml Chymostatin, 0,5 µg/ml Pepstatin A, 0,01 mg/ml Antipainhydrochlorid, 0,01 mg/ml Leupeptinhemisulfat (alle von der Firma Sigma), gelöst in PBS [7,75 mM Na₂HPO₄, 1,15 mM NaH₂PO₄ (Merck, Darmstadt), 0,15 M NaCl, pH 7,2]. Nun mußte das synthetisierte Protein aus den Bakterien freigesetzt werden. Dazu wurde das gewonnene Extrakt mit Phenylmethylsulfonylfluorid [PMSF, Endkonzentration 1mM (Sigma)] versetzt und bei 4°C sonikiert (60s, Level 10, duty 50%, Sonopuls HD-70, Bandelin, Berlin). Das Ultrasonikat wurde bei 10.000 U/min und 4°C für 30 min zentrifugiert, der Überstand portioniert und bei -80°C tiefgefroren.

3.5. Affinitätsaufreinigung der Proteine

GST-NC16A1-5 und GST wurden unter Verwendung von Glutathion Agarose Beads [kleine Agarose Kügelchen (Sigma)] aufgereinigt (Giucide et al, 1993). Zuerst wurden die bei -20°C gefrorenen Beads (4 g) in 50 ml sterilem destillierten Wasser resuspendiert und dann bei 4°C über Nacht stehen gelassen. Die Beads füllte man am nächsten Tag in eine chromatographische Säule (Bio Rad Laboratories, Hercules, USA). Danach wurden die Beads dreimal mit PBS gewaschen. Währenddessen wurde bei -80 °C tiefgefrorener Zellextrakt (10 ml) auf Eis aufgetaut und nach dem Waschvorgang auf

die Säule gegeben. Die Säule wurde nun fest verschlossen und für 1 h bei 4°C auf dem Taumler bewegt. Während dieses Inkubationsvorgangs wurde der GST-Anteil des Fusionsproteins an Glutathion gebunden. Danach wurde das ungebundene Material verworfen, die Säule viermal mit PBS bei 4°C gewaschen und kontrolliert, ob der Waschvorgang erfolgreich abgeschlossen war, indem eine entnommene Probe bei OD 280 nm gegen den Leerwert von PBS im Spektralphotometer gemessen wurde. Sobald die Extinktionswerte auf Werte unter 0,2 abfielen, begannen wir mit der Elution des an die Beads gebundenen GST oder GST-Fusionsproteins. Zu diesem Zweck gab man 20 ml Elutionspuffer [0,01 M Glutathion (Sigma) in PBS, pH 7,5] über die Säule. Das Eluat wurde zu Portionen von 1 ml aliquotiert und die Extinktionswerte der einzelnen Proben bei OD 280 nm gegen den Leerwert (0,01 M Glutathion) bestimmt. Die Proben mit den höchsten Extinktionswerten wurden vereinigt, gemischt, wiederum aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Bevor ein weiteres GST-Fusionsprotein mit der Säule aufgereinigt werden konnte, wurden die Beads regeneriert. Dazu wurde einmal mit Glutathion, zweimal mit PBS und dreimal mit Boratpuffer [0,1 M Na₂B₄O₇ x 10 H₂O (Sigma), NaCl 0,5 M, pH 8,5], dreimal mit Essigpuffer [0,1 M Essigsäure (Roth, Karlsruhe), 0,5 M NaCl, pH 4,0] und zuletzt noch dreimal mit PBS gewaschen. Bis zur erneuten Verwendung wurden die regenerierten Agarose Beads in 0,05% NaN₃ Lösung (Merck, Darmstadt) in PBS bei 4°C gelagert.

Anschließend wurde mittels 15% SDS-PAGE (s.h. Kapitel 3.7.) das hergestellte Protein nachgewiesen und die Reinheit des Proteins überprüft. Dazu wurden Portionen der Sekundärkultur jeweils vor und nach IPTG-Zusatz, vor und nach der Aufreinigung des Proteins, sowie nach dem 1. Wachvorgang und nach dem Pooling der Portionen untersucht.

3.6. Bestimmung der Proteinkonzentration

3.6.1. Bio Rad Protein Assay

Dieser Assay basiert auf der Methode von Bradford. Durch die Addition eines sauren Farbstoffs [Coomassie Brilliant Blue G 250 (Merck), bei Proteinbindung Absorptionsmaximum bei 465-595 nm] stellt dieses System eine Möglichkeit der Konzentrationsbestimmung von löslichen Proteinen dar, deren Extinktion man im

Spektralphotometer bestimmen kann. Die Proteinlösung wurde mit 1 ml 1:5 verdünnter Bio Rad-Lösung versetzt und nach 5 min Inkubationszeit wurde die Extinktion im Spektralphotometer gemessen. Die Proteinmengen wurden dann gegen eine Standardkurve mit Proteinlösung bekannter Konzentration (Bio Rad Protein Assay Standard II) ermittelt.

3.6.2. OD 280-Bestimmung

Die Konzentration des direkt aus der Säule getropften Proteins wurde in je 1 ml Fraktionen bei einer optischen Dichte von 280 nm gemessen. Indem wir anschließend die ermittelten Werte durch die Konstante 1,35 dividierten, erhielten wir ein relatives Maß für die Proteinkonzentration.

3.6.3. Coomassie-Färbung des Gels

Dieses Verfahren verglich 4-5 verschiedene Verdünnungen von GST bzw. GST-BP180 NC16A mit 5 verschiedenen Verdünnungen von bovinem Serumalbumin [BSA, (Sigma)] auf einem Polyacrylamidgel. BSA stellte dabei ein Maß für die Proteinmenge in µg/ml dar. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 20 min auf dem Schüttler in Coomassie-Lösung (0,2% Coomassie in Entfärbelösung s.u.) gefärbt. Anschließend wurde das Gel mit einer Entfärbelösung aus Methanol und Essigsäure (45% Methanol, 10% Essigsäure in Aqua destillata) entfärbt, mit Wasser abgespült und in einen speziellen Rahmen zum Trocknen eingespannt. Durch den Vergleich der Dicke der BSA-Banden mit der Dicke der GST bzw. GST-NC16A Banden, konnte die Menge des geladenen Proteins semiquantitativ evaluiert werden.

3.7. SDS-PAGE und Immunoblot

Die Reaktivität der LAD-Seren sowie der Kontrollen an DH-Seren und der Negativkontrollen gesunder Freiwilliger (normale humane Spender, NHS) wurde mittels Immunoblot-Analyse mit rekombinantem affinitätsaufgereinigtem GST-NC16A bestimmt. Wenn nicht speziell vermerkt, stammten die meisten der für diese Verfahren

notwendigen Gerätschaften und Reagenzien von Bio Rad Laboratories (Hercules, USA).

Das rekombinante Protein wurde mit Hilfe von Natriumdodecyl Sulfat-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) fraktioniert und elektrophoretisch auf Nitrozellulose transferiert (Giudice et al, 1993; Zillikens et al, 1997). Dazu wurde ein Polyacrylamidgel gegossen, das sich aus einem 15% Trenngel und einem 5% Sammelgel zusammensetzte.

Tabelle I. Zusammensetzung von Trenn - und Sammelgel

	Sammelgel		Trenngel	
	5%	4%*	15%	8%*
30% Acrylamid [ml]	0.83	0.67	5.0	2.67
Aqua destillata [ml]	2.85	3.01	2.35	4.71
0.5 M Tris (pH 6.8) [ml]	1.25	1.25		
M Tris (pH 8.8) [ml]			2.5	2.5
10% SDS [μ l]	50	50	100	100
Tetramethyldiamin [μ l] (Sigma)	12	12	12	12
10% Amoniumpersulfat [μ l] (Sigma)	25	50	30	40

*Zur Verwendung der 8% und 4% Gele siehe Unterpunkt 4.1.

Das bei -80°C eingefrorene Protein wurde in der Zwischenzeit langsam auf Eis aufgetaut. Der Broad Molecular Weight Standard und das GST-BP180 NC16A Protein wurden im Verhältnis 4:1 mit fünffach SDS(+)-Lösung [10 %-(hydromethyl)-aminomethan, 50% Glycerol (Roth, Karlsruhe), 10% SDS, 0,01% Bromphenol (Merck, Darmstadt), 25% β -Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt), 312 mM Tris, pH 6,8] versetzt und zum Auffüllen der Geltasche mit einfach SDS nach Bedarf weiterverdünnt. Zur Denaturierung der Proteine wurde die Lösung vor dem Laden bei 100°C für 2 min gekocht. Nach dem Laden der Gele wurden diese in Laufpuffer (25 mM Tris-(hydromethyl)-aminomethan, 192 mM Glycin, 1% SDS in Aqua destillata, pH 8,3)

versenkt. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA und 499 V bei Raumtemperatur in ca. 1 h, d.h. solange bis die Farbstoffbande aus dem Gel herausgelaufen war. Danach wurde das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt und das Trenngel auf Nitrozellulose transferiert. Hierzu wurde das Gel in einer mit Transferpuffer [25mM Tris-(hydromethyl)-aminomethan, 192 mM Glycin destillata, 20% Methanol in Aqua destillata (Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland), pH 8,3] gefüllten Wanne auf die Nitrozellulose gelegt und zwischen zwei Blättern Blottingpapier und zwei Faserkissen in die speziellen Kassetten eingeklemmt. Dieses Sandwich wurde anschließend in eine spezielle Elektrophoresekammer überführt und in Transferpuffer versenkt. Der Transfer erfolgte bei 35 V, 150 mA und 4°C für 4 h. Ob der Transfer erfolgreich war, konnte man durch Fast-Green-Färbung [0,1% Fast Green FSF (Sigma), 10 % Methanol, 5% Essigsäure (Roth, Karlsruhe) in Aqua destillata] der Nitrozellulose kontrollieren. Die Färbezeit betrug bei Raumtemperatur ca. 1 min. Danach wurde die Nitrozellulose mit Aqua destillata abgespült und getrocknet. Außerdem wurde das Gel für 20 min in Coomassie-Lösung gefärbt, danach entfärbt und somit nachgewiesen, ob der Transfer des Proteins vollständig erfolgt war. Für die Entwicklungsmethode mit Diaminodiphenylbenzol (DAB) wurden die Seren 1:20 in 3% Magermilchpulver-Lösung (MMP) in TBST [0,02 M Tris-(hydromethyl)-aminomethan, 0,15 M NaCl, 0,01% Tween-20 (Sigma) in Aqua destillata, pH 7,5] verdünnt.

Um die unspezifische Reaktivität mit dem GST-Teil von GST-BP180 NC16A zu beseitigen, wurde jedes Serum zuvor mit rekombinantem unaufgereinigtem GST (bakterielles Zellysat) 1:5 präadsorbiert und bei 4°C über Nacht inkubiert (Flüssigphaseprotokoll aus Zillikens et al, 1997). Am nächsten Morgen wurden die Seren bei 4°C und 15.000 U/min für 15 min zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und der Bodensatz aus Antigen-Antikörper Komplexen und MMP verworfen.

Nach dem Transfer wurde eine Bande des Broad Molecular Weight Standard auf der Nitrozellulose markiert, um so später die Migration auf den einzelnen Nitrozellulosestreifen besser miteinander vergleichen zu können. Danach wurde die Nitrozellulose in Streifen geschnitten und mit je 1 ml 3% MMP-Lösung für eine Stunde auf dem Schüttler geblockt, um so unspezifische Bindungen der Antikörper an Protein und Nitrozellulose zu reduzieren. Anschließend wurde der Nitrozellulosestreifen mit den präadsorbierten Serumverdünnungen über Nacht bei Raumtemperatur auf dem

Schüttler geschwenkt. Am nächsten Morgen wurden die Seren abpipetiert und zur gegebenenfalls erneuten Verwendung im Kühlschrank gelagert. Die Streifen wurden mit TBST 5×4 min lang gewaschen und anschließend für weitere 15 min geblockt. Währenddessen wurde die Verdünnung des Sekundärantikörpers Kaninchen Anti-Human IgA (Jackson Immunosearch Laboratories, USA) von 1:1.000 in 3% MMP-Lösung hergestellt. Daraufhin folgte die Inkubation der Streifen mit jeweils 1 ml dieser Verdünnung des zweiten Antikörpers für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur. Nach dem Abschluß der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Nitrozellulosestreifen für 5×4 min in TBST gewaschen. Danach folgte der Färbevorgang mit je 1 ml Diaminodiphenylbenzol (DAB) als chromogenem Substrat [1 Tablette DAB, 1:1.000 H₂O₂ (Merck, Darmstadt) in Aqua destillata]. Zu beachten war, daß die Auflösung der DAB-Tabletten auf Grund der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffes unter abgedunkelten Bedingungen stattfinden sollte. Der Färbevorgang wurde mit je 1 ml 0,1% Natriumacid in Aqua destillata gestoppt (Reaktionszeit 30 sec). Die Reaktionszeit des Färbevorgangs lag im allgemeinen bei 30 Sekunden. Es wurde genau der Zeitpunkt ermittelt, zu dem die Negativkontrollen gerade eben noch negativ und die Positivkontrolle aber bereits positiv geworden war. Danach wurden die Streifen in Aqua destillata gespült, getrocknet und für die Auswertung auf Papier aufgeklebt.

Alternativ zur oben beschriebenen Färbemethode wurden Immunoblots nach der Methode des Enhanced Chemiluminescence (ECL) (Amersham Life Science Ltd, Little Chalfont, England) gefärbt. Da die gesamte Nitrozellulose später in die ECL Multi Screen Apparatur eingespannt werden mußte, wurden diesmal keine Streifen geschnitten. Mit diesem System erfolgte die Verdünnung der präadsorbierten Seren (Verdünnung erneut 1:20) mit TBST in 1% BSA (für ca. 20 min gerührt). Als Blockingpuffer verwendeten wir 5 % MMP-Lösung (Reaktionszeit 45 min). Dabei war zu beachten, daß der Blockingpuffer ca. 1 h vor der Verwendung angesetzt werden und gut durchmischt sein mußte, da ansonsten der Hintergrund bei der nachfolgenden Entwicklung zunahm. Anschließend wurde zweimal kurz, 1×15 und 2×5 min lang gewaschen. Dann wurden die präadsorbierten Seren auf die in den Apparat eingespannte Nitrozellulose gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurde die Nitrozellulose mit einer 1:12.000-fachen Verdünnung des zweiten Antikörpers [Peroxidase konjugierter Kaninchen Anti-Human

IgA (Jackson Immunosearch Laboratories, USA) in TBST + 1% BSA] für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem letzten Waschvorgang mit TBST folgte die Entwicklung mit der ECL-Lösung aus Luminol und Peroxid im Verhältnis 1:1. Die für 1 min in ECL-Lösung inkubierte Nitrozellulose wurde in eine Röntgenkassette gelegt und danach mit Hilfe eines Chemifluoreszenzfilms (Hyperfilm ECL, Amersham, Little Chalfont, Großbritannien) in der Dunkelkammer für einige Sekunden belichtet.

4. Resultate

4.1. Überprüfung der Spezifität des Peroxidase konjugierten Kaninchen Anti-Human IgA-Antikörper

Um die Spezifität des in unserer Arbeit verwendeten sekundären Antikörpers zu überprüfen, überluden wir SDS-Gele (8% Trenngel und 4% Sammelgel) mit affinitätsaufgereinigtem humanen IgA und IgG (Dako, Glostrup, Dänemark). Diese Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose transferiert und mit dem in dieser Arbeit verwendeten Peroxidase konjugierten affinitätsaufgereinigten F(ab)₂-Fragment Kaninchen Anti-Human Serum IgA (Jackson Immunosearch Laboratories, USA) inkubiert. Wie erwartet reagierte der Kaninchen Anti-Human IgA-Antikörper mit aufgereinigtem IgA, aber nicht mit aufgereinigtem IgG. Die gleiche Kontrolle führten wir auch mit affinitätsaufgereinigtem humanem IgG und IgA (Dako) und Peroxidase konjugiertem affinitätsaufgereinigtem Anti-Human IgG (Dako) durch. Auch hier fand sich, wie erwartet, eine Reaktion von humanem IgG mit Anti-Human IgG und keine Reaktion mit humanem IgA und Anti-Human IgG.

4.2. Bestimmung der relativen Sensitivität des Peroxidase konjugierten Kaninchen Anti-Human IgA-Antikörpers

Die optimale Sensitivität unseres Antikörper wurde mittels Immunoblot von einem stark positiven LAD-Serum und einem normalen humanen Serum gegen GST-NC16A1-5 etabliert. Anfänglich hatten wir mit dem gleichen Antikörper der Firma Dako gearbeitet und hatten für diesen Antikörper mittels einer Verdünnungsreihe eine optimale Verdünnung von 1:50 ermittelt. Auf Grund von Lieferschwierigkeiten der Firma stellten wir später unsere Versuche auf den Antikörper der Firma Jackson Immunosearch Laboratories um, den wir bei einer Verdünnung von 1:1.000 einsetzten.

4.3. Vergleich der Entwicklungsmethode ECL mit DAB

Das ECL-System war für den Nachweis von Immunoblots mit IgG als erstem Antikörper von unserer Arbeitsgruppe gut etabliert worden. Trotz langwieriger Versuche mit dem ECL-System gelang es nicht, konsistente und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, so daß dieses Ziel nicht weiter verfolgt wurde.

4.4. Eine Untergruppe von LAD-Patienten zeigt Reaktivität mit BP180 NC16A5

Wir untersuchten 50 LAD hinsichtlich ihrer Reaktivität im Immunoblot mit BP180 Fusionsprotein, GST-NC16A1-5, das die gesamte NC16A Domäne von BP 180 enthält. Um eine mögliche Immunreaktivität mit dem GST-Teil dieses Fusionsproteins zu eliminieren, wurden die Patienten- und Kontrollseren mit dem bakteriellen Lysat, das rekombinantes GST enthält, präadsorbiert. 11 der 50 getesteten LAD-Seren wiesen eine spezifische Immunreaktivität auf. (**Abbildung 2**). Alle 50 getesteten Seren gesunder Freiwilliger (NHS), sowie alle 16 getesteten Dermatitis Herpetiformis-Seren wiesen keine spezifische Immunreaktivität mit BP180 NC16A auf.

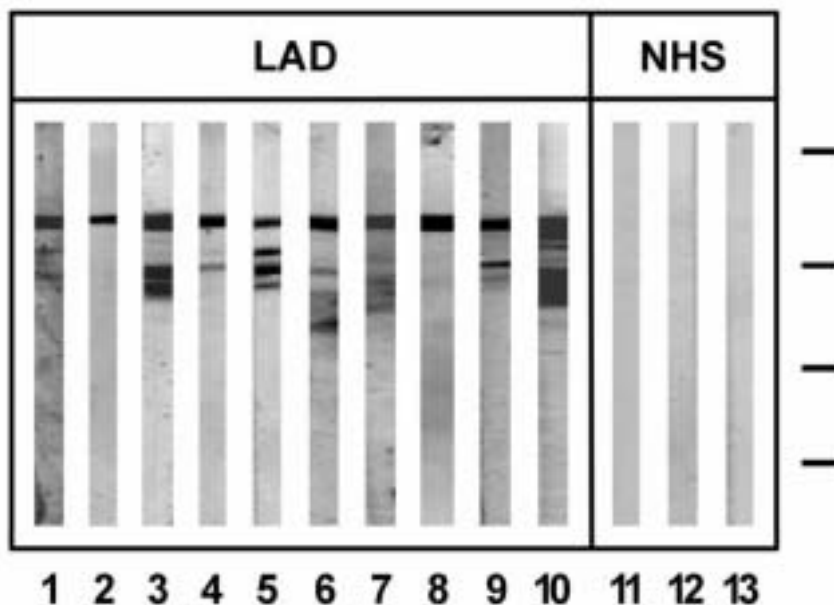


Abbildung 2: Eine Untergruppe von LAD Seren reagiert mit dem rekombinanten BP180 NC16A.

Affinitätsaufgereinigtes BP180 NC16A wurde mit 15% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferriert. Die Streifen wurden mit LAD-Seren (Reihe 1-10) und Seren gesunder Freiwilliger (NHS, Reihe 11-13) inkubiert. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:20 verwendet und mit rekombinantem GST präadsorbiert, um unspezifische Reaktivität mit dem GST Anteil des Fusionsproteins zu vermeiden. GST-NC16A in seiner vollen Länge hat ein Molekulargewicht von 35,5 kDa. Die darunterliegenden Banden repräsentieren Degradationsprodukte des intakten Proteins. Die Migrationspositionen der Molekulargewichtsmarker von 45, 31, 21 und 14 kDa sind rechts angezeigt.

Zwei der 11 Seren, die IgA-Antikörper gegen NC16A aufweisen, waren CBDC-Patienten. Keine IgA-Reaktivität mit BP180 NC16A1-5 wurde bei 16 Seren von Patienten mit Dermatitis herpetiformis oder 50 Seren gesunder Kontrollen gefunden.

Die folgende Tabelle faßt die Angaben zu Alter, Geschlecht sowie Ergebnissen in der direkten und indirekten Immunfluoreszenz mit IgA zusammen.

Uns interessierte weiterhin, ob anhand der uns zur Verfügung stehenden Daten Unterschiede zwischen der Gruppe der LAD-Patienten, die Autoantikörper gegen BP180 NC16A aufwies, und dem Rest der Patienten bestehen. Wir fanden allerdings bezüglich Alter, Geschlecht und dem Auftreten von IgG zusätzlich zu IgA in der Immunfluoreszenz zwischen der Gruppe von BP180NC16A-positiven Seren gegenüber der Gruppe von BP180NC16A-negativen keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellen (geprüft wurde mit dem exakten Test nach Fischer). Die vollständige Tabelle aller Patientendaten inklusive der Ergebnisse einiger Patientenserum in der direkten Immunfluoreszenz mit C3 befindet sich im Anhang.

Tabelle II: IgA-Immunoblotreaktivität mit BP180 NC16A bei den verschiedenen Untergruppen von LAD-Patienten

IgA-Immunoblot mit BP180NC16A	Anzahl der Patienten	Alter in Jahren	Geschlecht	Nachweis von IgA-Autoantikörpern in der indirekte Immunfluoreszenz mit IgA +
LAD _E im Immunoblot +	9	60	4 m/5 w	7/9
LAD _K im Immunoblot +	2	2	2 m/0 w	1/2
LAD _E im Immunoblot -	32	65	14 m/18 w	20/32
LAD _K im Immunoblot -	7	7,4	3 m/4 w	6/6
LAD _E insgesamt getestet	41	64	18 m/23 w	27/41
LAD _K insgesamt getestet	9	6,2	5 m/4 w	7/8

LAD_E + bzw.-: Lineare IgA Dermatoze des Erwachsenen: im IgA-Immunoblot mit BP180 NC16A positiv bzw. negativ

LAD_K +bzw.-: Lineare IgA Dermatoze des Kindes (chronisch bullöse Dermatoze des Kindesalters, CBDC):

im IgA-Immunoblot mit BP180 NC16A positiv bzw. negativ

Die anschließenden Tabellen fassen die Daten der Patienten zusammen, die auf IgA als Antikörper in der direkten und indirekten Immunfluoreszenz getestet wurden und im Immunoblot mit BP180 NC16A positiv bzw. negativ getestet wurden. Da ein Teil der Patienten nicht getestet wurde und so nicht eindeutig einer der beiden Gruppen zugeordnet werden konnten, sind diese Patienten in der folgenden Tabelle nicht mehr aufgeführt.

Tabelle III: IgA-Immunoblot Reaktivität mit BP180 NC16A der verschiedenen Untergruppen von Patienten mit LAD hinsichtlich der IgA- bzw. IgA- und IgG-Reaktivität an der DEJ in der direkten und/oder indirekten Immunfluoreszenz

	Direkte Immunfluoreszenz und/oder indirekte Immunfluorenz mit Nachweis von IgA an der DEJ	Direkte Immunfluoreszenz und/oder indirekte Immunfluorenz mit Nachweis von sowohl IgA als auch IgG an der DEJ	Summe
LAD _E im Immunoblot +	4	4	8
LAD _K im Immunoblot +	2	0	2
LAD _E im Immunoblot -	17	11	28
LAD _K im Immunoblot -	4	2	6
Summe	27	17	44

5. DISKUSSION

5.1. BP180 als Zielantigen bei verschiedenen klinischen Varianten blasenbildender Erkrankungen

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß BP180 ein Zielantigen für Antikörper verschiedener blasenbildender Autoimmunerkrankungen darstellt. Dazu gehören das bullöse Pemphigoid, das Pemphigoid gestationis, das vernarbende Pemphigoid, der Lichen planus pemphigoides und das Zentrum unserer Studie die lineare IgA Dermatose (Zillikens et al, 1997 und 1999; Giudice et al, 1993; Morrison et al, 1988; Balding et al, 1996; Bedane et al, 1997; Nie und Hashimoto 1999). NC16A stellt die immundominante Domäne der IgG-Antikörper beim bullösen Pemphigoid, Pemphigoid gestationis und Lichen planus pemphigoides dar (Zillikens et al, 1997 und 1999). Die hier vorgelegte Studie demonstriert, daß eine Untergruppe von LAD-Patienten (11 von 50) die BP180 NC16A Domäne erkennen. Die Frage nach der Feinspezifität der Anti-BP180 Autoantikörper bei LAD sowie deren Subklassenzugehörigkeit ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

5.2. Biosynthetische Beziehung zwischen BP180, LAD-1 und BP180 NC16A

Neueste biochemische und immunologische Forschungsergebnisse dokumentieren signifikante Unterschiede dieser Proteine. Es ist seit langem bekannt, daß LAD-Seren mit LABD 97 und LAD-1 (genauso wie mit epidermalen oder von Keratinozyten stammenden Antigenen von 97 und 120 kDa) reagieren. Allerdings erkennen sie aus Epidermis isoliertes BP180 nicht (Marinkovich et al, 1996; Zone et al, 1998). Mittlerweile gibt es überzeugende Beweise dafür, daß sowohl das 97 kDa wie auch das LAD-1 Antigen Segmenten der extrazellulären Domäne von BP180 entsprechen (Pas et al, 1997 und 1999; Hirako et al, 1998; Schäcke et al, 1998; Zone et al, 1998). Biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen zufolge wird das 120 kDa Protein in der Nähe der membranüberbrückenden Domäne des BP180 Antigen, also wahrscheinlich in der Nähe der NC16 A Region, proteolytisch abgespalten. Das von

BP180 abgespaltene 120 kDa Fragment wird anscheinend von der Oberfläche basaler Keratinozyten ins Medium abgesondert. Das 97 kDa Protein dürfte ein Degradationsprodukt des 120 kDa Proteins darstellen, wodurch es zum Verlust des C-terminalen Segment von BP180 kommt (Balding et al, 1997; Hirako et al, 1998; Marinkovich et al, 1996; Zone et al, 1996 und 1998).

Da die meisten LAD-Seren mit LABD97 bzw. LAD-1 reagieren, nicht aber mit der vollen Länge von BP180, könnte es bei der proteolytischen Abspaltung dieser beiden Fragmente zur Bildung von Neoepitopen kommen.

5.3. Welche Rolle spielt BP180 NC16A als Zielantigen?

Bisher ist von einigen blasenbildenden Autoimmunerkrankungen, die BP180 NC16A erkennen, bekannt, daß sie gegen verschiedene Epitope auf BP180 NC16A gerichtet sind. IgG-Autoantikörper von BP-Seren erkennen vier eng aneinandergereihte Epitope innerhalb der N-terminalen 45 Aminosäuren der BP180 NC16A Domäne (NC16A1; NC16A2; NC16A2,5; NC16A3) (Zillikens et al, 1997). Gegen die verbleibenden 28 Aminosäuren des C-terminalen Anteils (NC16A4 und NC16A5) fand sich im Serum von BP-Patienten keine nennenswerte Reaktivität (Zillikens et al, 1997). Die gleichen Epitope werden von Autoantikörpern im Serum von Patienten mit Pemphigoid gestationis-Seren erkannt (Chimanovitch et al, 1999). Lichen planus pemphigoides-Seren dagegen erkennen zusätzlich ein Epitop im C-terminalen Anteil von NC16A, die den BP-assoziierten Epitopen direkt benachbart sind (NC16A4) (Zillikens et al, 1999). Interessanterweise zeigt die von Zone et al. (1998) durchgeführte Sequenzanalyse, daß dem LABD97 Antigen die N-terminalen 41 Aminosäuren des NC16A fehlen. Die N-terminale Sequenz des 97 kDa Proteins beginnt 42 AS stromabwärts der transmembranären Domäne bei Aminosäure 532 des BP180 Proteins und schließt das C-terminale Ende von Region 3 und die Regionen 4 und 5 mit ein (Schmidt und Herzele, 1999). Folglich fehlt dem LABD97 Protein die hauptsächliche Zielregion von IgG-Antikörpern im Serum von BP und Pemphigoid gestationis-Seren.

In dieser Studie konnten wir zeigen, daß eine Untergruppe von LAD-Patienten (11 von 50 Patienten) ebenfalls mit der NC16A Domäne reagiert. Die Epitope NC16A1; NC16A2; NC16A2,5 und der N-terminale Abschnitt von NC16A3 sind nicht auf dem

97 kDa Antigen repräsentiert. Daraus ergibt sich die Frage, ob LAD-Antigene mit diesen Epitopen reagieren, und/oder ob sie mit den auf dem 97 kDa repräsentierten Epitopen NC16A4 und NC16A5 reagieren. Dieser Frage sollte durch ein Epitopmapping mit LAD-Seren nachgegangen werden. Es wäre interessant, ob manche LAD-Seren weitere spezifische Epitope von Junctionszonen zwischen den bekannten GST-NC16A Fusionsproteinen erkennen. Zu diesem Zweck müßten weitere rekombinante Proteine mit wie NC16A1,5; NC16A3,5 und NC16A4,5 hergestellt werden. Da nur ein kleiner Teil von LAD-Seren die NC16A Domäne erkennt, ist anzunehmen, daß es weitere LAD-assoziierte Epitope auf der BP180 Ektodomäne gibt (Balding et al, 1996).

Weiterhin gilt es zu erforschen, wie viele der in dieser Arbeit im Immunoblot mit NC16A getesteten Seren das 120 kDa bzw. das 97 kDa Protein erkennen. Für den Fall, daß die mit NC16A reaktiven Seren nicht mit diesen beiden Proteinen reagieren, muß der antigene Abschnitt innerhalb der N-terminalen 42 AS von NC16A liegen, die dem 120 bzw. 97 kDa Protein fehlen. Durch diese Ergebnisse und die Sequenzierungsanalyse des 120 kDa Proteins könnte man in Zukunft mehr über die Epitope, die von LAD-Seren erkannt werden, erfahren.

5.4. Heterogenes Erkennungsmuster von Autoantigenen bei LAD-Patienten

Bisher wurde oft berichtet, daß einige LAD-Seren das (von Keratinozyten stammende bzw. epidermale) LAD-1 und LABD97, aber nicht das aus Epidermis isolierte BP180 erkennen (Marinkovich et al, 1996; Zone et al, 1998). Entgegen früherer Berichte konnte man vor kurzem zeigen, daß es durchaus Seren von Patienten mit dem klinischen Bild und den typischen Befunden einer linearen IgA Dermatoze in der Immunfluoreszenz gibt, die ein 180 kDa Protein, das aus Haut und Keratinozyten extrahiert wurde, erkennen. Dieses 180 kDa Protein komigriert mit dem BP180 Protein (Berard et al, 1996; Ghohestani et al, 1997; Arechalde et al, 1999; Schmidt und Herzele, 1999). Es gibt Seren, die BP180 NC16A erkennen, aber oft nicht BP180 in seiner gesamten Länge (Zillikens et al, 1999).

Eine Erklärung dafür, warum manche Seren nur ein Fragment der extrazellulären Domäne (97 bzw. 120 kDa Protein) erkennen, könnte sein, daß sowohl LAD wie auch BP-Seren in einzelnen Fällen konformationelle Epitope erkennen, die erst nach der Abspaltung der Fragmente von Autoantikörpern erkannt werden (Schmidt und Herzele, 1999).

Einige Patienten erkennen zwar BP180 NC16A, aber nicht das aus Keratinozyten extrahierte BP180. Eine Ursache dafür könnte sein, daß der Immunoblot Assay sensitiver im Nachweis von anti-BP180 Antikörpern ist, wenn rekombinantes BP180 eingesetzt wurde, als der Immunoblot mit BP180, das aus Epidermis oder Keratinozyten isoliert wurde (Zillikens et al, 1997). Das könnte darin begründet sein, daß einerseits mehr Protein vorhanden ist, oder, daß andererseits Epitope leichter zugänglich sind (Matsumura et al, 1996).

Egan et al. (1999) erklärt das Phänomen des heterogenen Erkennungsmusters von Autoantigenen bei BP-Patienten damit, daß es nach einer initialen Antikörperantwort gegen BP180 durch Epitope spreading zu einer Ausbreitung auf andere Epitope wie das 97 kDa Protein (das auch von manchen BP-Seren erkannt wird) kommen könnte. Der gleiche Mechanismus könnte auch für die lineare IgA Dermatoze von Bedeutung sein. Es gibt Hinweise, daß während des Verlaufs einer Immunerkrankung die B- und T-Zellantwort nicht auf ein einzigartiges immundominantes Epitop beschränkt ist, sondern daß im Verlauf der Erkrankung weitere Epitope innerhalb des gleichen Proteins erkannt werden (Chan et al, 1998). Dieses Phänomen wird Epitope spreading genannt und könnte für die Aufrechterhaltung und die Progression der Erkrankung wichtig sein (Chan et al, 1998; Gordon et al, 1994; Vanderlugt and Miller, 1996). Durch das Phänomen des Epitope spreading könnte erklärt werden, warum es bei einer Reihe von Patienten zwei verschiedene Isotypen an Antikörpern (IgA und IgG) gegen das gleiche Antigen gibt. Verschiedene Epitope könnten das Immunsystem durch verschiedene Wege stimulieren mit der Folge der Sekretion von unterschiedlichen Zytokinen, die eine wichtige Rolle beim Immunglobulinklassenwechsel spielen (Esser und Radbruch, 1990). Petersen et al. (1986) beschrieben einen Patienten, bei dem es zu einem Immunglobulinklassenwechsel von IgA zu IgG im Laufe der Erkrankung kam. Erst kürzlich wurde über einen Patienten unserer Klinik berichtet, der sowohl IgA wie auch IgG-Reaktivität im Immunoblot mit BP180 NC16A aufwies. Zu Beginn seiner

Erkrankung zeigten sich sowohl lineare IgA als auch, wenn auch in geringerem Ausmaß, IgG-Antikörper in der Immunfluoreszenz. Im weiteren Verlauf befiel die Erkrankung bei diesem Patienten auch die Schleimhäute. Zu diesem Zeitpunkt konnte man in der direkten und indirekten Immunfluoreszenz nur noch IgA-Antikörper nachweisen (Schmidt et al, 1999). Setterfield et al. (1998) zeigten für das Schleimhautpemphigoid, daß mit dem gemeinsamen Auftreten von IgA und IgG-Antikörpern ein schwererer Krankheitsverlauf einhergeht. Inwieweit ein Epitopwechsel und/oder ein Immunklassenwechsel mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung korreliert, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

5.5. Gibt es Unterschiede im klinischen Bild bei der gegen BP180 NC16A reagierenden LAD-Untergruppe ?

Wie schon für Patienten mit vernarbendem Schleimhautpemphigoid gezeigt, besteht auch bei LAD-Patienten die Möglichkeit, daß sie mit verschiedenen Epitopen auf der BP180 Ektodomäne reagieren. Bedane et al. (1997) stellten die Frage, ob im Falle von Patienten mit vernarbendem Schleimhautpemphigoid anhand der unterschiedlichen Bindungsmuster verschiedener blasenbildender Erkrankungen auch das jeweilige klinische Bild erklärt werden könnte, wie es z.B. für das Schleimhautpemphigoid versus bullösem Pemphigoid bekannt ist. Eventuell läßt sich somit erklären, wann und ob es zu Mukosabeteiligung oder Narbenbildung kommt. Mukosabeteiligung mit narbiger Abheilung wird sowohl bei CP-Patienten (Balding et al, 1996) als auch bei LAD-Patienten gefunden (Wojnarowska et al, 1988).

Auf Grund dieser Überlegungen fanden wir anhand der uns zur Verfügung stehenden Daten , daß bezüglich Alter, Geschlecht und des Auftretens von IgG zusätzlich zu IgA in der Immunfluoreszenz zwischen der Gruppe von BP180NC16A-positiven Seren und der Gruppe von BP180NC16A-negativen keine statistisch signifikanten Unterschiede bestehen. Dennoch ist es durchaus möglich, daß bei eingehender Prüfung weiterer klinischer Untersuchungsbefunde wie z.B. Mukosabeteiligung sowie einer geeignet großen Stichprobengröße, signifikante Unterschiede auftreten. Nicht in allen Fällen standen uns jedoch detaillierte Ergebnisse der klinischen Untersuchung zur Verfügung. Eine prospektive Studie, die multizentrisch durchgeführt wird, geht derzeit der

möglichen Korrelation zwischen dem klinischen Phänotyp und der Spezifität der Autoantikörper nach.

6. SCHLUSSFOLGERUNG

In der vorgelegten Studie konnte gezeigt werden, daß eine Untergruppe von LAD bzw. CBDC-Patienten (11 von 50) im Immunoblot mit BP180 NC16A reagiert. IgA-Antikörper dieser Untergruppe von LAD-Patienten reagieren somit mit dem gleichem immunodominanten Abschnitt, der auch von IgG-Antikörpern beim bullösen Pemphigoid und Pemphigoid gestationis erkannt wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die bisherige Hypothese, daß es sich bei der LAD-Erkrankung um eine heterogene Erkrankungsgruppe handelt. Ziel weiterer Untersuchungen sollte die Klärung der pathogenetischen Relevanz von IgA-Antikörpern gegen BP180 NC16A sein. Die Frage nach der Feinspezifität der Anti-BP180 NC16A Autoantikörper bei LAD sowie deren Subklassenzugehörigkeit ist Gegenstand weiterer derzeitiger Untersuchungen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die lineare IgA Dermatose (LAD) ist eine subepidermal blasenbildende Erkrankung, die durch IgA-Ablagerungen an der kutanen Basalmembran charakterisiert ist. Die IgA-Antikörper von LAD-Seren reagieren mit einem 97 kDa Protein, das aus der Epidermis extrahiert werden kann, und einem 120 kDa Protein, das von kultivierten Keratinozyten in das Zellkulturmedium sezerniert wird. Beide Antigene stellen Fragmente der extrazellulären Domäne des 180 kDa bullösen Pemphigoid-Autoantigens (BP180, Typ XVII Kollagen) dar. Die vorliegende Studie ging der Frage nach, ob LAD-Seren mit der immunodominanten Region von BP180 (NC16A Region) unmittelbar an der Zellmembran der basalen Keratinozyten reagieren. Diese Region ist das Ziel der IgG-Antikörper im Serum der meisten Patienten mit bullösem Pemphigoid und Pemphigoid gestationis. Tatsächlich zeigte sich im Immunoblot bei 11 von 50 LAD-Patienten eine Reaktivität von IgA-Antikörpern mit einer rekombinanten Form von BP180 NC16A. Wir fanden bezüglich Alter, Geschlecht und immunfluoreszenzoptischer Befunde keine signifikanten Unterschiede zwischen der BP180 NC16A-positiven Gruppe verglichen mit der Gruppe von LAD-Patienten, die keine Reaktivität mit NC16A aufwiesen. Weitere Studien sollten die pathogenetische Relevanz der gegen BP180 NC16A gerichteten IgA-Autoantikörper im Serum von LAD-Patienten untersuchen.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Allen J, Zhou S, Wakelin SH, Collier PM, Wojnarowska F: Linear IgA disease: a report of two dermal binding sera which recognize a pepsin-sensitive epitope (?NC-1 domain) of collagen type VII. *Br J Dermatol* 137:526-533, 1997
- Arechalde A, Braun RP, Calza AM, Hertl M, Didierjean L, Saurat JH, Borradori L: Childhood bullous pemphigoid associated with IgA antibodies against BP180 or BP230 antigens. *Br J Dermatol* 140:112-118, 1999
- Aultbrinker EA, Starr MB, Donnenfeld ED: Linear IgA disease. The ocular manifestations. *Ophthalmology* 95:340-343, 1988
- 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* 106:1, 141-146, 1996
- Balding SD, Diaz LA, Giudice GJ: A recombinant form of the human BP180 ectodomain forms a collagen-like homotrimeric complex. *Biochemistry* 36:8821-8830, 1997
- Bedane C, Mc Millan JR, Balding SD, Bernard P, Prost C, Bonnetblanc JM, Diaz LA, Eady RAJ, Giudice GJ: 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, 1997
- Berard F, Kanitakis J, Di Maio M, Ghohestani R, Hermier C, David L, Claudy A, Faure M: Linear IgA bullous dermatosis in children with autoantibodies against 180 kDa pemphigoid antigen. *Arch Pediatr* 3:345-347, 1996
- Bhogal BS, Wojnarowska F, Marsden RA, Das A, Black MM, McKee PH: Linear IgA bullous dermatosis of adults and children: an immunoelectron microscopic study. *Br J Dermatol* 117:289-296, 1987
- Blenkinsopp WK, Haffenden GP, Fry L, Leonard JN. Histology of linear IgA disease, dermatitis herpetiformis and bullous pemphigoid. *Am J Dermatopathol* 5:547-554, 1983

- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7; 72:248-254, 1976
- Borradori L, Chavanas S, Schaapveld RY, Gagnoux-Palacios L, Calafat J, Meneguzzi G, Sonnenberg A. Role of bullous pemphigoid antigen 180 (BP180) in the assembly of hemidesmosomes and cell adhesion - reexpression of BP180 in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa keratinocytes. *Exp Cell Res* 239:463-476, 1998
- Bouloc A, Vignon-Pennamen MD, Caux F, Teillac D, Wechsler J, Heller M, Lebbe C, Flageul B, Morel P, Dubertret L, Prost C: Lichen planus pemphigoides is a heterogeneous disease: a report of five cases studied by immunoelectron microscopy. *Br J Dermatol* 138:972-980, 1998
- Caux F, Kirtschig G, Lemarchand-Venencie F, Venencie PY, Hoang-Xuan T, Robin H, Dubertret L, Prost C. IgA-epidermolysis bullosa acquisita in a child resulting in blindness. *Br J Dermatol* 137:2, 270-275, 1997
- Chan LS, Vanderlugt CJ, Hashimoto T, et al: Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases. *J Invest Dermatol* 110:103-109, 1998
- Chimanovitch I, Schmidt E, Messer G, Döpp R, Partsch K, Bröcker EB, Giudice GJ, Zillikens D. IgG1 and IgG3 are the major immunoglobulin subclasses targeting epitopes within the NC16A domain of BP180 in pemphigoid gestationis. *J Invest Dermatol* 113:140-142, 1999
- Chorzelski TP, Jablonska S. IgA dermatosis of childhood (chronic bullous disease of childhood). *Br J Dermatol* 101:535-542, 1979
- Dabrowski J, Chorzelski TP, Jablonska S, Krainska T, Jarzabek-Chorzelska M. Immunoelectron microscopic studies in IgA linear dermatosis. *Arch Dermatol Res* 265:289-298, 1979
- Darling T, Mc Grath JA, Yee C, et al: Premature termination codons are present on both alleles of the bullous pemphigoid antigen 2 (BPAG2) gene in five Austrian families with generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 108:463-468, 1997

- Darling TN, Cardenas AA, Beard JS, Sau P, Yee CL, Zone JJ, Yancey KB: A child with antibodies targeting both linear IgA bullous dermatosis and bullous pemphigoid antigens. *Arch Dermatol* 131:1438-1442, 1995
- Diaz LA, Ratrie H III, Saunders WS, Futamura S, Squiquera HL, Anhalt GJ, Giudice GJ: Isolation of a human epidermal cDNA corresponding to the 180-kDa autoantigen recognized by bullous pemphigoid and herpes gestationis sera. Immunolocalization of this protein to the hemidesmosome. *J Clin Invest* 86:1088-1094, 1990
- Dmochowski M, Hashimoto T, Bhogal BS, Black MM, Zone JJ, Nishikawa T: Immunoblotting studies of linear IgA disease. *J Dermatol Sci* 6:194-200, 1993
- Egan CA, Taylor TB, Meyer LJ, Petersen MJ, Zone JJ: Bullous pemphigoid sera that contain antibodies to BPAg2 also contain antibodies to LABD97 that recognize epitopes distal to the NC16A domain. *J Invest Dermatol* 112(2):148-152, 1999
- Esser C, Radbruch A: Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. *Annu Rev Immunol* 8:717-735, 1990
- Faber WR, Van Joost T. Juvenile pemphigoid. *Br J Dermatol* 89:519-522, 1973
- Gammon WR, Briggaman RA, Inman AO III, Queen LL, Wheller CE: Differentiating anti-lamina lucida and anti-sublamina densa anti-BMZ antibodies by indirect immunofluorescence on 1.0 sodium chloride-separated skin. *J Invest Dermatol* 82:139-144, 1984
- Ghohestani RF, Nicolas JF, Kanitakis J, Claudy A: Linear IgA bullous dermatosis with IgA antibodies exclusively directed against the 180- or 230-kDa epidermal antigens. *J Invest Dermatol* 108:854-858, 1997
- 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: Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180 ectodomain. *J Immunol* 151:5742-5750, 1993
- Gordon T, Topfer F, Keech C, Reynolds P, Chen W, Rischmueller M, McCluskey J: How does autoimmunity to La and Ro initiate and spread? *Autoimmunity* 18:87-92, 1994

- Haase C, Büdinger L, Borradori L, Yee C, Merck HF, Yancey K, Hertl M: Detection of IgG autoantibodies in the sera of patients with bullous and gestational pemphigoid: ELISA studies utilizing a baculovirus-encoded form of bullous pemphigoid antigen 2. *J Invest Dermatol* 110:282-286, 1998
- Hashimoto T, Ishiko A, Shimizu H, Tanaka T, Dodd HJ, Bhogal BS, Black MM, Nishikawa T: A case of linear IgA bullous dermatosis with IgA anti-type VII collagen autoantibodies. *Br J Dermatol* 134:336-339, 1996
- Hirako Y, Usukura J, Hashimoto T, Kitajima Y, Owaribe K: Cleavage of BP180, a 180-kDa bullous pemphigoid antigen, yields a 120-kDa collagenous extracellular polypeptide. *J Biol Chem* 273:9711-9717, 1998
- Hirako Y, Usukura J, Kematsu J, Nishizawa Y, Owaribe K: Demonstration of the molecular shape of BP180, a 180-kDa bullous pemphigoid antigen and its potential for trimer formation. *J Biol Chem* 271: 13739-13745, 1996
- Hopkinson SB, Baker SE, Jones JC: Molecular genetic studies of a human epidermal autoantigen (the 180-kD Bullous pemphigoid antigen/BP180): identification of functionally important sequences within the BP180 molecule and evidence for an interaction between BP180 and alpha 6 integrin. *J Cell Biol* 130:117-125, 1995
- Hwang R, Rodman OG. Chronic bullous dermatosis of childhood: a vesicular variant (linear IgA dermatosis). *Int J Dermatol* 24:241-242, 1985
- Ishiko A, Shimizu H, Masunaga T, Hashimoto T, Dmochowski M, Wojnarowska F, Bhogal BS, Black MM, Nishikawa T: 97-kDa linear IgA bullous dermatosis (LAD) antigen localizes to the lamina lucida of the epidermal basement membrane. *J Invest Dermatol* 106:739-743, 1996
- Jonkman MF, de Jong MC, Heeres K, Pas HH, van der Meer JB, Owaribe K, Martinez de Velasco AM, Niessen CM, Sonnenberg A: 180-kD bullous pemphigoid antigen (BP180) is deficient in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *J Clin Invest* 95:1345-1352, 1995

- Kárpáti S, Stolz W, Meurer M, Krieg T, Braun-Falco O: Ultrastructural immunogold studies in two cases of linear IgA dermatosis. Are there two distinct types of this disease? *Br J Dermatol* 127:112-118, 1992
- Kromminga A, Scheckenbach C, Georgi M, Hagel C, Arndt R, Christophers E, Bröcker EB, Zillikens D: Patients with bullous pemphigoid and linear IgA disease show a dual IgA and IgG autoimmune response to BP180. *J Autoimmun* 15:293-300, 2000
- 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
- Leonard JN, Haffenden GP, Ring NP, Fry L: Linear IgA disease in adults. *Br J Dermatol* 107:301-316, 1982
- Leonard JN, Wright P, Williams DM, et al: The relationship between linear IgA disease and benign mucous membrane pemphigoid. *Br J Dermatol* 110:307-314, 1984
- Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, Giudice GJ: 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, 1993
- 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. *Journal Immunol* 155:5449-5454, 1995
- Liu Z, Giudice GJ, Swartz SJ, Fairley JA, Till GO, Troy JL, Diaz LA: The role of complement in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 95:1539-1544, 1995
- Masunaga T, Shimizu H, Yee C, Borradori L, Lazarova Z, Nishikawa T, Yancey KB: The extracellular domain of BPAG2 localizes to anchoring filament and its carboxyl terminus extends to the lamina densa of normal human epidermal basement membrane. *J Invest Dermatol* 109:200-206, 1997
- Marinkovich MP, Lunstrum GP, Keene DR, Burgeson RE: The dermal-epidermal junction of human skin contains a novel laminin variant. *J Cell Biol* 119:695-703, 1992

- Marinkovich MP, Taylor TB, Keene DR, Burgeson RE, Zone JJ: LAD-1, the linear IgA dermatosis autoantigen, is a novel 120 kDa anchoring filament protein synthesized by epidermal cells. *J Invest Dermatol* 106:734-738, 1996
- Marinkovich MP, Tran HH, Rao SK, Giudice GJ, Balding S, Jonkman MF, Pas HH, McGuire JS, Herron GS, Bruckner Tuderman L: LAD-1 is absent in a subset of junctional epidermolysis bullosa patients. *J Invest Dermatol* 109:3, 356-359, 1997
- Matsumura K, Amagai M, Nishikawa T, Hashimoto T: The majority of bullous pemphigoid and herpes gestationis serum samples react with the NC16A domain of the 180 kDa bullous pemphigoid antigen. *Arch Dermatol Res* 288:507-509, 1996
- Marsden RA, McKee PH, Bhogal B, Black MM, Kennedy LA: A study of benign chronic bullous dermatosis of childhood and comparison with dermatitis herpetiformis and bullous pemphigoid occurring in childhood. *Clin Exp Dermatol* 5:159-176, 1980
- McGrath JA, Gatalica B, Christiano AM, et al: Mutations in the 180-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG2), a hemidesmosomal transmembrane collagen (COL17A1) in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Nat Genet* 11:83-86, 1995
- McGrath JA, Pulkkinen L, Christiano AM, Leigh IM, Eady RAJ, Uitto J: Altered laminin 5 expression due to mutations in the gene encoding the β chain (LAMB3) in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 104:467-474, 1995
- Murakami H, Hashimoto T, Bhogal BS, et al: Analysis of cicatricial pemphigoid antigens. *J Dermatol Sci* 17:39-44, 1998
- Morrison LH, Labib RS, Zone JJ, Diaz LA, Anhalt GJ: Herpes gestationis autoantibodies recognize a 180-kDa human epidermal antigen. *J Clin Invest* 81:2023-2026, 1988
- Nie Z, Hashimoto T: IgA antibodies of cicatricial pemphigoid sera specifically react with the C-terminus of BP180. *J Invest Dermatol* 112:254-255, 1999

- Pas HH, Kloosterhuis GJ, Heeres K, van der Meer JB, Jonkman MF: Bullous pemphigoid and linear IgA dermatosis sera recognize a similar 120 kDa keratinocyte collagenous glycoprotein with antigenic cross-reactivity to BP180. *J Invest Dermatol* 108:423-429, 1997
- Perriard J, Jaunin F, Favre B, Büdinger L, Hertl M, Saurat J-H, Borradori L: IgG autoantibodies from bullous pemphigoid (BP) patients bind antigenic sites on both the extracellular and the intracellular domains of the BP antigen 180. *J Invest Dermatol* 112:141-147, 1999
- Peters MS, Rogers RS: Clinical correlations of linear IgA desposition at the cutaneous basement membrane zone. *J Am Acad Dermatol* 20:761-770, 1989
- Petersen MJ, Gammon WR, Briggaman RA: A case of linear IgA disease presenting initially with IgG immune deposits. *J Am Acad Dermatol* 14:1014-1019, 1986
- Pohla-Gubo G, Lazarova Z, Giudice GJ, Liebert M, Grasseger A, Hintner H, Yancey KB: Diminished expression of the extracellular domain of bullous pemphigoid antigen 2 (BPAG2) in the epidermal basement membrane of patients with generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol* 4:199-206, 1995
- Prost C, De Leca AC, Combemale P, et al: Diagnosis of adult linear IgA dermatosis by immunoelectronmicroscopy in 16 patients with linear IgA deposits. *J Invest Dermatol* 92:39-45, 1989
- Reddy D, Muller P, Tran H, Nguyn N, Schaecke H, Bruckner-Tuderman L, Giudice G, Marinkovich P: The extracellular domain of BP180 binds laminin 5. *J Invest Dermatol* 110:593, 1998
- Rose C, Dieterich W, Bröcker EB, Schuppan D, Zillikens D: Circulating autoantibodies to tissue transglutaminase differentiate patients with dermatitis herpetiformis from those with linear IgA disease. *J Am Acad Dermatol* 41:957-961, 1999
- Rusenko KW, Gammon WR, Briggaman RA: Type VII collagen is the antigen recognized by IgA anti-sublamina densa autoantibodies. *J Invest Dermatol* 92:510, 1989
- Sakai LY, Keene DR, Morris NP, Burgeson RE: Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J Cell Biol* 103:1577-1586, 1986

- 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
- Schäcke H, Schumann H, Hammami-Hauasli N, Raghunath M, Bruckner-Tuderman L: Two forms of collagen XVII in keratinocytes. A full-length transmembrane protein and a soluble ectodomain. *J Biol Chem* 273:25937-25943, 1998
- Schmidt E, Herzele K, Schumann H, et al: Linear IgA disease with circulating IgA antibodies against the NC16A domain of BP180. *Br J Dermatol* 140:964-966, 1999
- Shimizu H, Takizawa Y, Pulkkinen L, Zane JJ, Matsumoto K, Saida T, Uitto J, Nishikawa T: The 97 kDa linear bullous dermatosis antigen is not expressed in a patient with generalized atrophic benign epidermolysis bullosa with a novel homozygous G258X Mutation in Col17A1. *J Invest Dermatol* 11:887-892, 1998
- Vanderlugt CJ, Miller SD. Epitope spreading. *Curr Opin Immunol* 8:831-836, 1996
- Wakelin SH, Allen J, Zhou S, Wojnarowska F: Drug-induced linear IgA disease with antibodies to collagen VII. *Br J Dermatol* 138:2,310-314, 1998
- Willsteed E, Bhogal B, Black M, McKee P, Wojnarowska F: Use of 1M NaCl split skin in the indirect immunofluorescence of the linear IgA bullous dermatoses. *J Cutan Pathol* 17:144-148, 1990
- Wilson BD, Beutner EH, Kumar V, Chorzelski TP, Jablonska S: Linear IgA bullous dermatosis: an immunologically defined disease. *Int J Dermatol* 24:569-574, 1985
- Wojnarowska F, Marsden RA, Bhogal B, Black MM: Chronic bullous disease of childhood, childhood cicatricial pemphigoid, and linear IgA disease of adults. A comparative study demonstrating clinical and immunopathologic overlap. *J Am Acad Dermatol* 19:5 Pt 1, 792-805, 1988
- Wojnarowska F, Whitehead P, Leigh IM, Bhogal BS, Black MM: Identification of the target antigen in chronic bullous disease of childhood and linear IgA disease of adults. *Br J Dermatol* 124:157-162, 1991
- Wojnarowska F, Allen J, Collier P: Linear IgA Disease: a heterogeneous disease. *Dermatology* 189:52-56, 1994

- Wojnarowska F, Collier PM, Allen J, Millard PR: The localization of the target antigens and antibodies in linear IgA disease is heterogenous and dependent on the methods used. *Br J Dermatol* 132:750-757, 1995
- Yaoita H, Katz SI: Circulating IgA anti-basement membrane zone antibodies in dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol* 69:558-560, 1977
- Zambruno G, Manca V, Kanitakis J, Cozzani E, Nicolas JF, Gianetti A: Linear IgA bullous dermatosis with autoantibodies to a 290 kDa antigen of anchoring fibrils. *J Am Acad Dermatol* 31:884-888, 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, Kawahara Y, Ishiko A, et al: A novel subepidermal blistering disease with autoantibodies to a 200 kDa antigen of the basement membrane zone. *J Invest Dermatol* 106:1333-1336, 1996
- Zillikens D, Rose PR, Balding SD, Liu Z, Olague-Marchan M, Diaz LA, Giudice GJ: Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. *J Invest Dermatol* 109:573-579, 1997
- Zillikens D, Mascaro JM, Rose PR, et al: A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 109:679-683, 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, 1998
- Zillikens D, Caux F, Mascaro JM, et al: Autoantibodies in lichen planus pemphigoides target a novel epitope within the C-terminal NC16A domain of BP180. *J Invest Dermatol* 113:117-121, 1999
- Zillikens D, Herzele K, Georgi M, Schmidt E, Chimanovitch J, Schumann H, Mascaro JM, Diaz LA, Bruckner-Tuderman L, Bröcker EB, Giudice GJ: Autoantibodies in a subgroup of patients with linear IgA disease react with the NC16A domain of BP180. *J Invest Dermatol* 113:947-953, 1999
- Zillikens D: Acquired skin disease of hemidesmosomes. *J Dermatol Sci* 20:134-154, 1999

- Zone JJ, Taylor TB, Kadunce DP, Meyer LJ: Identification of the cutaneous basement membrane zone antigen and isolation of antibody in linear immunoglobulin A bullous dermatosis. *J Clin Invest* 85:812-820, 1990
- Zone JJ, Smith EP, Powell D, Taylor TB, Smith JB, Meyer LJ: Antigenic specificity of antibodies from patients with linear basement membrane deposition of IgA. *Dermatology* 189:64-66, 1994
- Zone JJ, Taylor T, Kadunce DP, et al: IgA antibodies in chronic bullous disease of childhood react with a 97-kDa basement membrane zone protein. *J Invest Dermatol* 106:1277-1280, 1996
- Zone JJ, Taylor TB, Meyer LJ, Petersen MJ: 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, 1998

9. Anhang

9.1. Tabelle aller LAD-Seren

Patient mit Nummer	Diagnose	Geschlecht	Alter	IgA-Immunoblot mit BP180 NC16A	Direkte IF mit Nachweis von IgA an der DEJ	Indirekte IF auf NaCl-separierter Spalthaut mit Nachweis von IgA an der epidermalen Seite	Direkte IF mit Nachweis von IgG an der DEJ	Direkte IF mit Nachweis von C3 an der DEJ	Indirekte IF auf NaCl-separierter Spalthaut mit Nachweis von IgG an der epidermalen Seite
1	LAD	m	75 J	+++	+	1:40 +	+ perifollikulär	+	+
2	LAD	w	55 J	+	+	+	-	+	(+-)
3	LAD	w	63 J	+	+	+	+		+
4	LAD	w	72 J	+	+++	+	-	-	-
5	LAD	m	2 J	+	+	-			-
6	LAD	w	60 J	+	+	+			-
7	LAD	m	43 J	+	+	+			
8	LAD	m	66 J	+	+	-			-
9	LAD	w	54 J	+	+	+			+
10	LAD	m	50 J	+	+	-			+
11	LAD	m	2 J	+	++/+++	+	-	+	
12	LAD	w	68 J	-	+++	+	+	-	-
13	LAD	w	1 J	-	+	++			-
14	LAD	w	43 J	-	+	++			-
15	LAD	m	9 J	-	+	+++			-
16	LAD	w	70 J	-	+	-			
17	LAD	m	72 J	-	+	++			
18	LAD	w	76 J	-	+	+	-	+	-
19	LAD	m	51 J	-	+	-			-
20	LAD	w	60 J	-	++	+	++	+ granulär	-
21	LAD	m	63 J	-	+	(+-)	-	+	-
22	LAD	w	32 J	-	+	-	-		+
23	LAD	m	62 J	-	+	1:80 ++	-	++ Gefäße	-
24	LAD	w	70J	-	+	1:40 ++	-	+	

25	LAD	w	54 J	-	++	1:40 +	-	+	+
26	LAD	w	81 J	-	+	+	-	+	-
27	LAD	m	75 J	-	+	(+-)			-
28	LAD	m	88 J	-	+	(+-)			+
29	LAD	m	72 J	-	+	-			-
30	LAD	m	71 J	-	+	-			-
31	LAD	m	69 J	-	+	-			-
32	LAD	w	45 J	-	+	+	+		
33	LAD	w	77 J	-	+	+	+	-	-
34	LAD	m	45 J	-	+	+	-		
35	LAD	w	75 J	-	+	+	-	+	-
36	LAD	m	17 J	-	+	+			1:2 +
37	LAD	w	45 J	-	+	-	+		+
38	LAD	w	66 J	-	+	+	-	+	-
39	LAD	w	2 J	-	+	1:320 +	-	-	-
40	LAD	w	8 J	-	+	++	+		+
41	LAD	w	64 J	-	+	++			
42	LAD	w	74 J	-	+	1:20 +	+	-	+
43	LAD	w	69 J	-	++	(+-)	+		+
44	LAD	m	77 J	-	+	+++	-	-	(+-)
45	LAD	m	89 J	-	+	+	-	-	-
46	LAD	w	79 J	-	+	+	+	+	
47	LAD	m	13 J	-	+	+			-
48	LAD	m	46 J	-	+	+	-	+	-
49	LAD	w	3 J	-	+	kein Serum			
50	LAD	w	42 J	-	++	(+-)	-	+	-

IF steht für Immunfluoreszenz.

-(+)-stehen für negative oder nicht eindeutig positive und damit als negativ gewertete Befunde.

+ / ++ / +++ stehen für schwach positiv, positiv, stark positiv, sehr stark positiv in dem jeweiligen Test.

Zusätzliche Angaben wie z.B. 1:40 + bedeuten, daß hier der jeweilige Test z.B. bis zu einer Verdünnung von 1:40 positiv war.

Wenn keine Angaben gemacht wurden, bezieht sich das Ergebnis auf eine Verdünnung von 1:10.

9.2. Tabelle aller DH-Seren

Patient mit Nummer	Diagnose	Geschlecht	Alter	Ig A-Immunoblot mit BP180 NC16A	Direkte Immunfluoreszenz mit Nachweis von IgA in den Papillenspitzen	Indirekte Immunfluoreszenz mit Nachweis von IgA an Endomysium	Indirekte Immunfluoreszenz mit Nachweis von IgG an Endomysium
1	M. Duhring			-		+	-
2	M. Duhring			-		+	-
3	M. Duhring			-		+	-
4	M. Duhring			-		++	-
5	M. Duhring			-		+	-
6	M. Duhring	m	23 J	-	+	+	
7	M. Duhring	w	24 J	-	-	+	
8	M. Duhring	m	21 J	-	+	+	
9	M. Duhring	m	62 J	-	+	+	
10	M. Duhring	m	56 J	-	+	+	
11	M. Duhring	m	40 J	-	+	+	
12	M. Duhring	m	31 J	-	+	+	
13	M. Duhring	m	65 J	-	-	+	
14	M. Duhring	w	34 J	-		+	
15	M. Duhring	m		-	+	(+)	
16	M. Duhring	m	21 J	-	-	+	

9.3. Publikationen

Originalarbeiten:

Zillikens D, Herzele K, Georgi M, Schmidt E, Chimanovitch J, Schumann H, Mascaro JM, Diaz LA, Bruckner-Tuderman L, Bröcker EB, Giudice GJ. Autoantibodies in a subgroup of patients with linear IgA disease react with the NC16A domain of BP180. J Invest Dermatol 113:947-953, 1999

Schmidt E, Herzele K, Schumann H, Wesselmann U, Chimanovitch J, Bruckner-Tuderman L, Bröcker EB, Giudice GJ, Zillikens D. Linear IgA disease with circulating antibodies against the NC16A domain of BP180. Br J Dermatol 140:964-966, 1999

Abstracts:

Herzele K, Zillikens D, Schmidt E, Krenig H, Mascaro JM, Messer G, Chan LS, Olague-Marchan M, Lin MS, Diaz LA, Bröcker EB, Giudice GJ: Autoantibodies in a subgroup of patients with linear IgA disease react with NC16A domain of BP180. 3rd Joint Meeting of ESDR, JSID and SID, 07.-10.5.1998, Cologne. J Invest Dermatol 110:510, 1998

Schmidt E, Obe K, Chimanovitch I, Herzele K, Reimer S, Bröcker EB, Giudice GJ, Zillikens D: Zirkulierende Autoantikörper gegen BP180: Die Reaktivität im ELISA korreliert mit der Krankheitsaktivität des bullösen Pemphigoids. 40. Jahrestagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 12.-15.05.1999, Hamburg. Hautarzt 50:S38, 1999

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. D. Zillikens möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas, die stete Diskussionsbereitschaft und Beratung herzlich danken.

Frau H. Krenig und Frau C. Siedel gilt mein besonderer Dank für die fachkundige Unterstützung, Geduld und motivierenden Worte, die entscheidend zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. H. Vogt gilt mein Dank für die Beratung und Unterstützung in Fragen der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Sehr hilfreich waren die konstruktiven Beiträge von Herrn M. Schmidt zur schriftlichen Ausarbeitung dieses Themas.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Dr. E. Schmidt für seine Unterstützung bei der Lösung von medizinischen und logistischen Problemen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir erst mein Studium und darüber hinaus die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Lebenslauf

Name	Herzele
Vorname	Karin
Geburtsdatum	06.07.1972
Geburtsort	Augsburg
1983 - 1992	Gymnasium Maria Stern, Augsburg
1992/1993	Freiwilliges Soziales Jahr, Evangelisches Diakonissenkrankenhaus, Augsburg
Mai 1993 – April 1999	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
April 1999 – März 2000	Praktisches Jahr: <ul style="list-style-type: none">• Innere Medizin in der Hämatologisch-Onkologischen Therapieambulanz der Medizinischen Poliklinik, Universität Würzburg• Chirurgie am Lehrkrankenhaus Liestal, Universität Basel• Anästhesie am Hôpital Civil, Universität Straßburg
Juni 2000	3. Staatsexamen
Januar 2001	Ärztin im Praktikum an der Klinik für Anästhesiologie, Universität Würzburg

Würzburg, den