

Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie  
Direktor: Professor Dr. med. Detlef Zillikens

In Zusammenarbeit mit der  
Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG  
Seekamp 31, 23560 Lübeck

vertreten in der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
durch Professor Dr. med. Jürgen Westermann,  
Direktor des Institutes für Anatomie der Universität zu Lübeck

# **Epitopmapping des epidermalen Autoantigens BP230**

Inauguraldissertation

aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Lübeck  
zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von  
Inga-Madeleine Blöcker  
aus Lübeck

Lübeck 2009

Ich erkläre an Eides statt, diese Arbeit selbstständig erstellt zu haben.

Lübeck, 14.12.2009

Als Dissertation genehmigt von  
der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Universität zu Lübeck

Tag der Prüfung: 20.04.2010

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Peters

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann  
Prof. Dr. rer. nat. Norbert Tautz

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>4</b>
1.1	Aufbau der Haut .....	4
1.2	Zielstrukturen für die Bindung von Autoantikörpern in der Haut.....	5
1.3	Blasenbildende Erkrankungen der Haut.....	9
1.4	Diagnose bullöser Autoimmundermatosen .....	12
1.5	Therapie bullöser Autoimmundermatosen .....	15
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit.....	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1	Chemikalien.....	16
2.2	Puffer und Lösungen .....	16
2.3	Kits .....	17
2.4	Antikörper und Enzymkonjugate .....	17
2.5	Seren.....	18
2.6	Zellkulturmedien .....	19
2.7	Restriktionsenzyme .....	19
2.8	cDNAs, DNA .....	19
2.9	Vektoren .....	19
2.10	Transformationsstamm ( <i>E. coli</i> ).....	20
2.11	Zelllinie.....	20
2.12	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	20
2.13	Molekularbiologische Methoden.....	21
2.13.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
2.13.1.1	Overlap-PCR .....	22
2.13.1.2	Oligonukleotide .....	23
2.13.2	Klonierungsübersichten.....	24
2.13.2.1	Für das bakterielle System .....	24
2.13.2.2	Für das eukaryotische System .....	27
2.13.3	DNA-Restriktionsanalyse.....	28
2.13.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	29
2.13.5	Ligation .....	29
2.13.6	Transformation von <i>E. coli</i> .....	29
2.13.7	Plasmidisolierung .....	30

2.13.8	Testexpression .....	30
2.13.9	DNA-Sequenzierung .....	30
2.13.10	Anzucht von <i>E. coli</i> im präparativen Maßstab .....	30
2.13.11	Transfektion von Säugerzellen .....	31
2.14	Herstellung eines polyklonalen anti-BP230-Antikörpers .....	31
2.15	Biochemische Methoden .....	32
2.15.1	Proteinaufreinigung .....	32
2.15.1.1	Aufschluss der Bakterien und Präparation von Einschlusskörperchen .....	32
2.15.1.2	Isolation von Einschlusskörperchen aus <i>E. coli</i> .....	32
2.15.1.3	Immobilisierte Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) .....	33
2.15.1.4	Kationenaustausch-Chromatographie .....	33
2.15.1.5	Proteinkonzentrations-Bestimmung (BCA) .....	34
2.15.1.6	TCA-Fällung .....	34
2.15.1.7	Massenspektrometrie .....	34
2.15.2	Enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) .....	35
2.15.3	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	35
2.15.4	Coomassie-Färbung .....	36
2.15.5	Proteintransfer auf eine Membran (Westernblot) .....	36
2.15.5.1	Miniaturisierung des Westernblot .....	36
2.15.6	Immunochemischer Nachweis .....	37
2.15.6.1	Ponceau-S-Färbung .....	37
2.15.6.2	Immunmarkierung .....	37
2.15.7	Indirekter Immunfluoreszenz Test (IFT) .....	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
3.1	Herstellung der Expressionskonstrukte (eukaryotisches System) .....	40
3.1.1	DNA-Klonierungsarbeiten .....	40
3.1.2	Testexpression .....	40
3.1.3	DNA-Sequenzierung .....	41
3.2	Analyse relevanter Epitope auf BP230 beim bullösen Pemphigoid .....	41
3.3	Herstellung der Expressionskonstrukte (bakterielles System) .....	49
3.3.1	DNA-Klonierungsarbeiten .....	49
3.3.2	Testexpression .....	52
3.3.3	Restriktionsanalyse .....	53
3.3.4	DNA-Sequenzierung .....	54

3.3.5	Korrektur von pET24d-N-BP230-C[+23] und -BP230-C1[+23].....	54
3.3.6	Biochemische Aufreinigung der Proteine .....	56
3.4	Analyse zur Rolle von linearen Epitopen des BP230 beim BP .....	61
3.5	ELISA mit BP230-C3.....	66
3.5.1	Entwicklung eines ELISA für das Polypeptid BP230-C3.....	66
3.6	Vergleich der Ergebnisse aus IFT, ELISA und Westernblot .....	68
3.7	Vergleich des Anti-BP230-C3-ELISA mit dem alternativen Testsystem.....	70
3.8	Komplettierung des Anti-BP180-NC16A-4X-ELISA (EUROIMMUN AG).....	70
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>72</b>
4.1	Entwicklung von BP230-Biochip-Mosaiken.....	74
4.2	Ermittlung der Grundgesamtheit von anti-BP230-Antikörpern.....	77
4.3	Differenzierung der anti-BP230-Antikörperbindung innerhalb des BP-Seren- Kollektivs .....	79
4.4	Expressionsanalyse des BP230-Voll-Längen Polypeptids.....	80
4.5	BP230-Epitopmapping .....	83
4.6	ELISA mit BP230-C3.....	84
4.7	Ausblick.....	86
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>97</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau der Haut

Die Haut wird grob unterteilt in Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subcutis (Unterhaut). Sie dient dem Körper als Grenzschrift zur Umwelt und übernimmt Stoffwechsel- und immunologische Funktionen. Zusätzlich bewahrt sie die Homöostase. Die mehrschichtige Epidermis besteht im Wesentlichen aus Keratinozyten, enthält Abwehrzellen des lymphatischen Systems sowie Sinneszellen für Berührungsreize. Ihr angrenzend befindet sich die Dermis. Diese besteht z. B. aus Kollagenfasern, Blut- und Lymphgefäßen, sowie Drüsen, Sinneszellen und den Haarwurzeln. Die Übergangszone zwischen Epidermis und Dermis wird als **dermo-epidermale Junktionszone (DEJ)** bezeichnet, in der sich die **Basal-Lamina**, eine nur im Elektronenmikroskop sichtbare Membran, befindet. Sie ist verantwortlich dafür, dass die ihr angrenzenden Gewebsschichten nicht auseinander gleiten. Zu ihren Bestandteilen zählen Kollagene (z. B. Typ VII Kollagen) und Glykoproteine (z. B. Laminin, Fibronectin). Die Basal-Lamina wird in drei Teilbereiche untergliedert: Lamina lucida, Lamina densa und Sublamina densa. Der Kontakt zwischen den basalen Keratinozyten und der Basal-Lamina wird durch die Hemidesmosomen (Halbplaque) vermittelt (Abbildung 1). Im Gegensatz dazu werden die Zellen untereinander durch die Desmosomen (Plaque) verbunden (Borradori *et al.*, 1996, Green *et al.*, 1996).

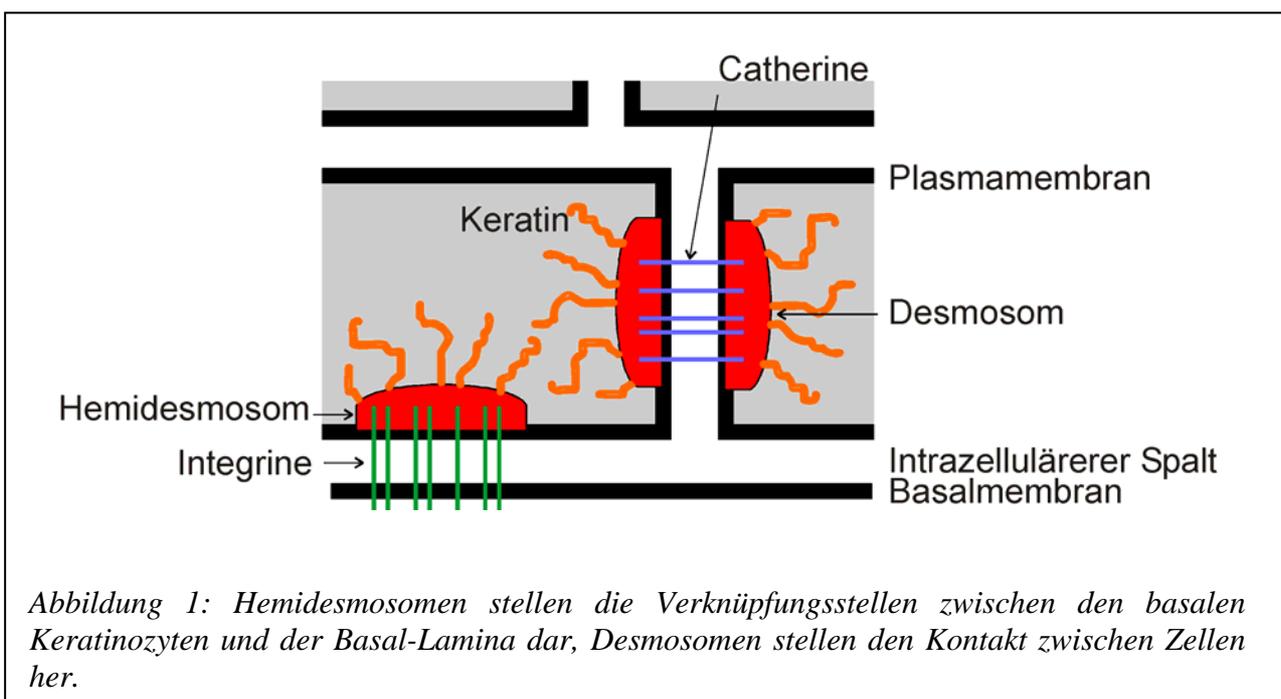
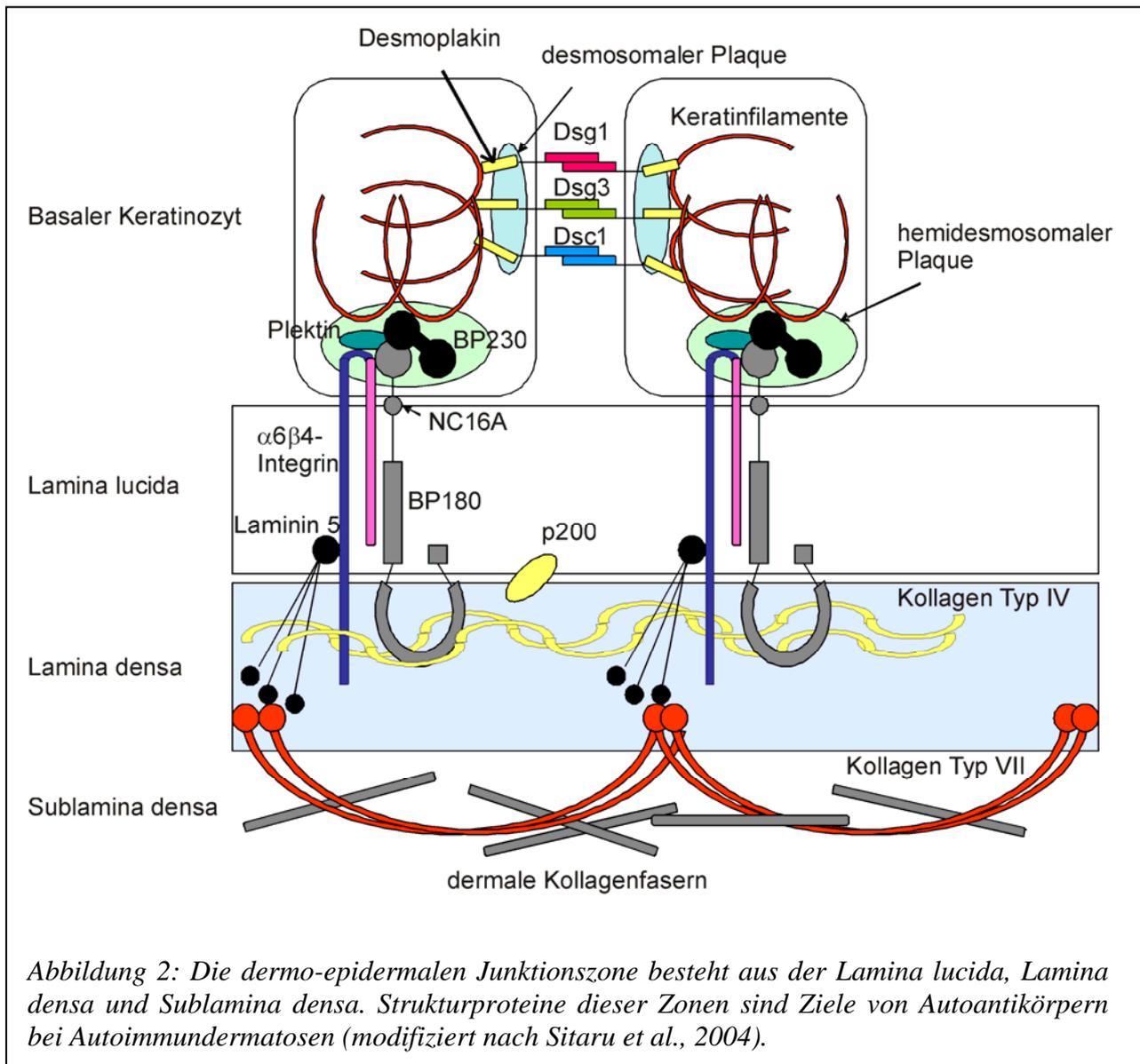


Abbildung 1: Hemidesmosomen stellen die Verknüpfungsstellen zwischen den basalen Keratinozyten und der Basal-Lamina dar, Desmosomen stellen den Kontakt zwischen Zellen her.

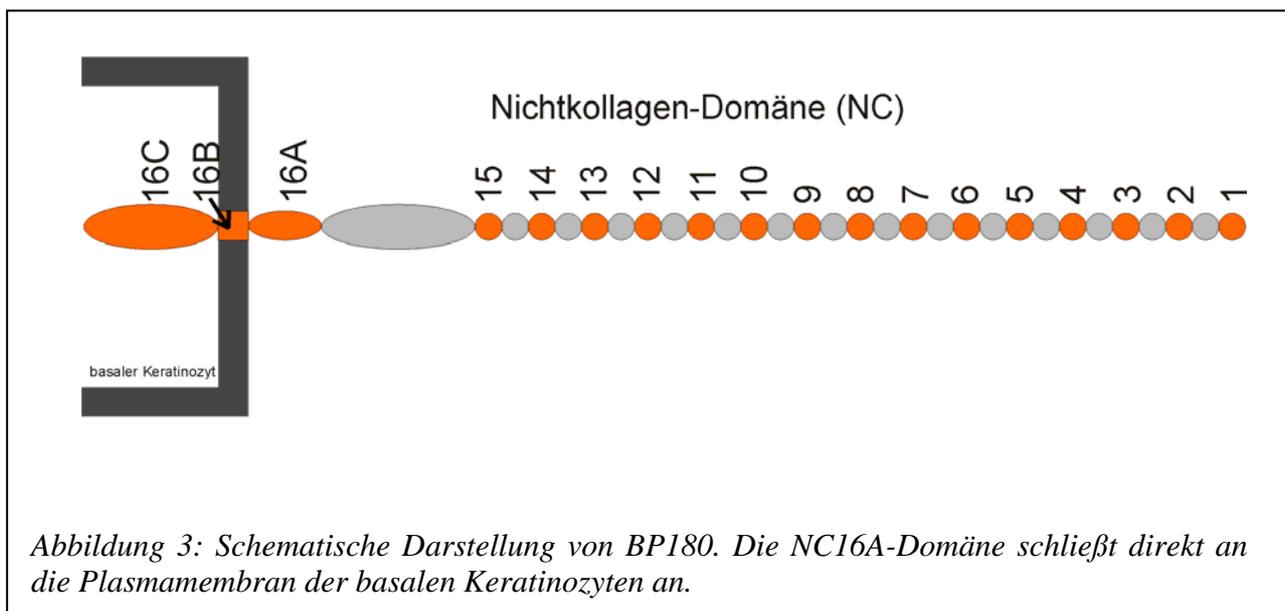
## 1.2 Zielstrukturen für die Bindung von Autoantikörpern in der Haut

Einige Proteine in der Haut stellen Zielstrukturen für die Bindung von Autoantikörpern dar (Abbildung 2), z. B. BP180 (BPAG2, Typ XVII Kollagen) und BP230 (BPAG1, Dystonin), zwei Proteine des Hemidesmosoms.



Bei **BP180** handelt es sich um ein Glykoprotein, das aus einer intrazellulären, einer Transmembran- und einer extrazellulären Domäne besteht. Der N-terminale Bereich ist im Zytosol der Keratinozyten lokalisiert und interagiert mit  $\alpha6\beta4$ -Integrin, einem Adhäsionsmolekül (Borradori *et al.*, 1999). Der C-terminale Bereich liegt extrazellulär vor

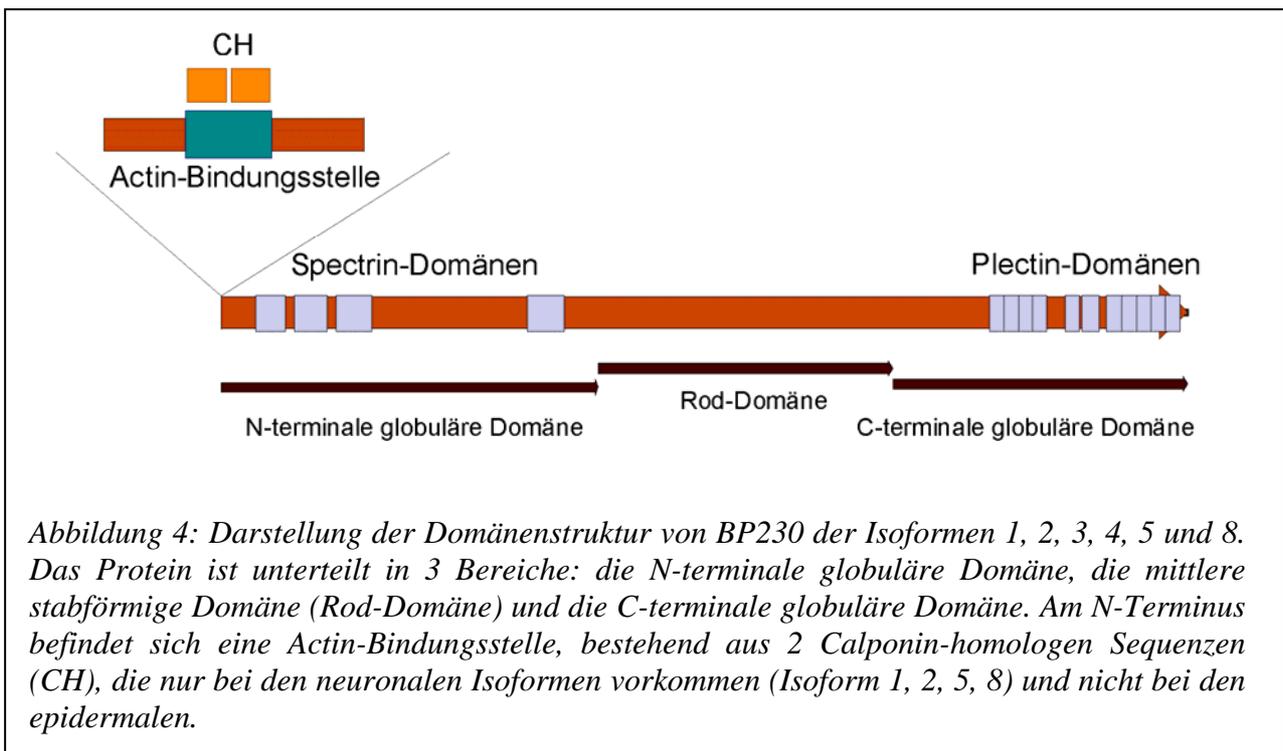
und besteht aus 15 Kollagen- und 16 Nichtkollagen-Domänen (Labib *et al.*, 1986, Diaz *et al.*, 1990, Giudice *et al.*, 1992, 1993, Masunaga *et al.*, 1997, Zillikens *et al.*, 1999, Hata *et al.*, 2000). Die 16. Nichtkollagen-Domäne reicht in den basalen Keratinozyten (Abbildung 3) hinein (NC16C). Ihr extrazellulärer Anteil (NC16A) stellt die bedeutendste Bindungsstelle für Autoantikörper beim bullösen Pemphigoid dar (Sitaru *et al.*, 2004). Er besteht aus 76 Aminosäuren (Döpp *et al.*, 2000). Neben der NC16A-Domäne identifizierten Perriard *et al.*, 1999 und Di Zenzo *et al.*, 2008 weitere Bindungsstellen für diese Autoantikörper auf BP180.



Die pathogenetische Bedeutsamkeit der gegen BP180-NC16A gerichteten Autoantikörper ist bekannt und ergibt sich aus folgenden Beobachtungen:

- (1) Bei Patienten mit Pemphigoid gestationis (Schwangerschaftspemphigoid) findet ein passiver Transfer von Autoantikörpern auf den Fötus statt, der sich durch Blasenbildung bei diesem äußert (Chorzelski *et al.*, 1976, Katz *et al.*, 1977).
- (2) Der Autoantikörpertiter im Serum korreliert mit der Krankheitsaktivität beim bullösen Pemphigoid und Pemphigoid gestationis (Schmidt *et al.*, 2000, Kobayashi *et al.*, 2002, Sitaru *et al.*, 2004).
- (3) Die Autoantikörper verursachen eine Einwanderung von Leukozyten in den Bereich der dermo-epidermalen Junctionszone, was zur Spaltbildung zwischen Dermis und Epidermis führt (Sitaru *et al.*, 2002, Herrero-Gonzalez *et al.*, 2006).
- (4) Beim passiven Transfer von Antikörpern gegen BP180 auf Hamster und Maus werden auch in diesen Blasen erzeugt (Liu *et al.*, 1993, Yamamoto *et al.*, 2002).

**BP230** ist ein intrazelluläres Protein (Stanley *et al.*, 1981, 1988, Sugi *et al.*, 1989, Tanaka *et al.*, 1991, Sawamura *et al.*, 1991, Hashimoto *et al.*, 1993) und zählt wie Desmoplakin, Plectin, Epiplakin, Periplakin und Envoplakin, sowie der Microtubule actin cross-linking factor 1 (MACF1) zur Plakin-Proteinfamilie. Die in den Epithelzellen lokalisierten Plakine treten mit den intermediären Filamenten in Kontakt und verleihen dem Gewebe Zugfestigkeit. BP230 (Abbildung 4) ist aus einer zentralen stabförmigen Domäne und zwei endständigen globulären Domänen aufgebaut (Green *et al.*, 1992, Ruhrberg *et al.*, 1997).

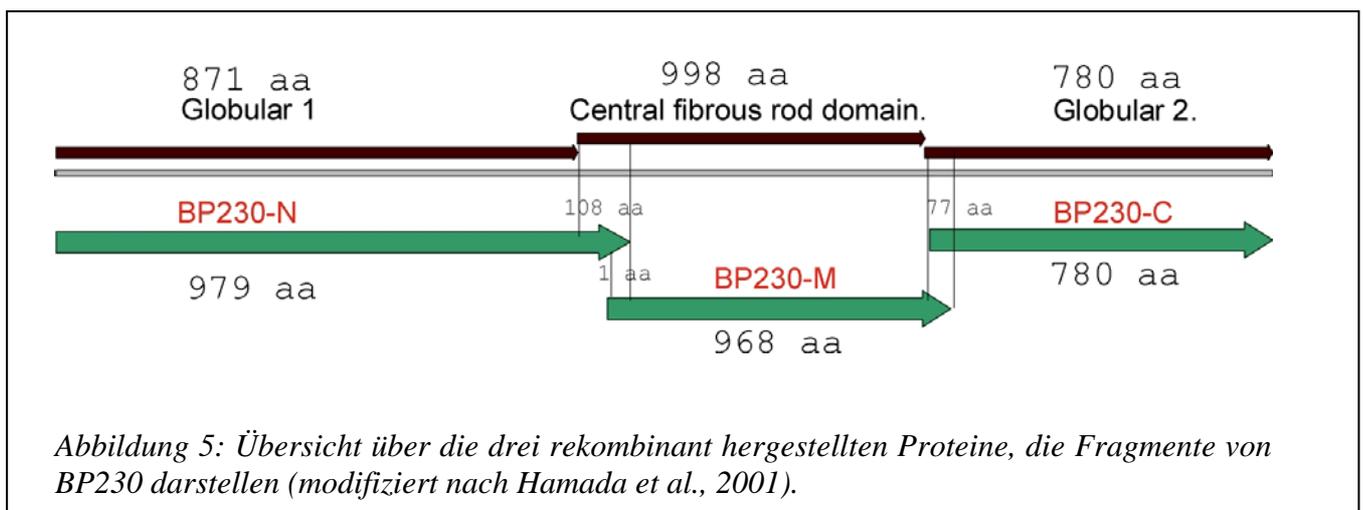


Die N-terminale globuläre Domäne wird als Plakin-Domäne bezeichnet und interagiert mit BP180 (Hopkinson *et al.*, 2000) und der  $\beta 4$ -Kette von  $\alpha 6\beta 4$ -Integrin (Sonnenberg *et al.*, 1999, Borradori *et al.*, 1999). Über seinen C-terminalen Bereich tritt BP230 mit den Keratinfilamenten im Hemidesmosom in Kontakt (Yancey *et al.*, 1995, Yang *et al.*, 1996).

Es existieren mindestens 10 Spleißvarianten von BP230, 4 neuronale und 6 epidermale. Die neuronalen Isoformen haben im N-terminalen Bereich eine Aktin-Bindungsstelle und 1 oder 2 Calponin-homologe Sequenzmotive. Die epidermale Isoform 3 (Genbankzugriffsnummer M69225) ist diejenige Variante, die durch Autoantikörper bei Patienten mit bullösem Pemphigoid gebunden wird (Stanley *et al.*, 1989, Sawamura *et al.*, 1991). Sie ist aus 24 Exons zusammengesetzt. Der N-terminale Bereich dieser Isoform ist definiert durch den

Sequenzbereich von 6 bis 3320 nt, die Rod-Domäne von 3321 bis 5633 nt und der C-terminale Bereich von 5634 bis 7955 nt.

Zunächst erfolgte der Nachweis der Antikörper gegen BP230 in Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid durch Immunpräzipitation z. B. mit Extrakten aus humanen Keratinozyten (Stanley *et al.*, 1981, Mueller *et al.*, 1989, Hashimoto *et al.*, 1999). Stanley *et al.* konnten 1984 diese Antikörperbindung durch Immunoblotting aufzeigen. Im Jahr 2000 exprimierten Skaria *et al.* Abschnitte von BP230 im eukaryotischen System und identifizierten weitere relevante Epitope außerhalb der C-terminalen globulären Domäne. Hamada *et al.*, 2001 unterteilten die ganze cDNA-Sequenz von BP230 in drei sich überlappende Abschnitte und exprimierten sie in Bakterienzellen (Abbildung 5). 80% der Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid reagierten mit dem Protein, das den C-terminalen Bereich darstellte. Die den mittleren und den N-terminalen Bereich repräsentierenden Proteine, reagierten nur zu 40% bzw. 38%.



Im Gegensatz zum BP180 korreliert der Serumspiegel der Autoantikörper für BP230 nicht mit der Krankheitsaktivität (Sitaru *et al.*, 2004). Besteht ein hoher BP180-Antikörpertiter, kann die Bildung von anti-BP230-Antikörpern zu einer Verstärkung der Krankheitsaktivität führen (Sitaru *et al.*, 2004). Die Rolle von BP230 in der Pathogenese des bullösen Pemphigoids ist nicht geklärt (Yoshida *et al.*, 2006).

### 1.3 Blasenbildende Erkrankungen der Haut

Das Auftreten von Blasen auf der Haut kann eine Vielzahl von Ursachen haben. Hierzu zählen Infektionen, Entzündungen, genetische oder mechanische Einwirkungen. In seltenen Fällen stellen Strukturproteine im hemi- oder desmosomalen Plaques, sowie die mit diesen in Verbindung stehenden Proteine in Epidermis und Dermis, Zielantigene für Autoantikörper dar und sind der Auslöser für eine blasenbildende Autoimmunkrankheit (Sitaru *et al.*, 2004).

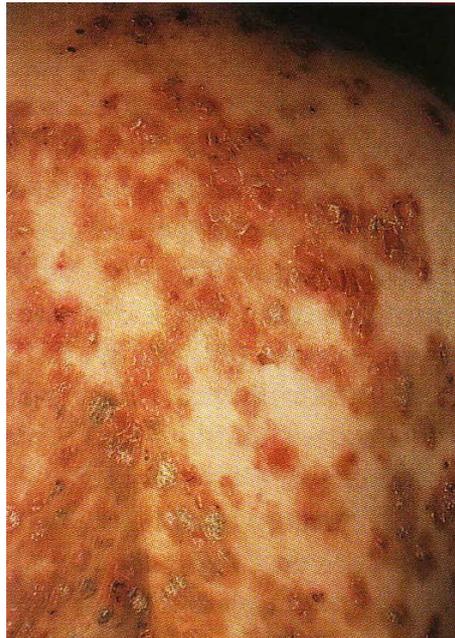
Bei den **bullösen Autoimmundermatosen** handelt es sich um eine Gruppe seltener, zum Teil lebensbedrohlicher, organspezifischer Krankheiten. Die Einteilung der bullösen Autoimmundermatosen erfolgt in Abhängigkeit der betroffenen Zielstrukturen. Es werden vier Gruppen unterschieden (Tabelle 1): die Pemphigus- und Pemphigoid-Gruppe, Epidermolysis bullosa acquisita und Dermatitis herpetiformis Duhring (Sitaru *et al.*, 2004).

*Tabelle 1: Übersicht über die Zielantigene bei den bullösen Autoimmundermatosen (Sitaru et al., 2004).*

Erkrankung		Autoantigene
<b>Pemphigus-Gruppe</b>	Pemphigus vulgaris	Dsg3, (Dsg1)
	Pemphigus foliaceus	Dsg1
	Paraneoplastischer Pemphigus	Dsg1, Dsg3, versch. Plakine
	IgA-Pemphigus	Dsc1, Dsg3
<b>Pemphigoid-Gruppe</b>	Bullöses Pemphigoid	BP180, BP230
	Pemphigoid gestationis	
	Schleimhautpemphigoid	BP180, Laminin 5, $\alpha 6\beta 4$ -Integrin
	Lineare IgA-Dermatose	LAD-1
<b>Epidermolysis bullosa acquisita</b>		Typ VII Kollagen
<b>Dermatitis herpetiformis Duhring</b>		Transglutaminase

**Pemphigus-Erkrankungen** kommen häufig bei Patienten in einem Alter zwischen 40 und 60 Jahren vor. Die Inzidenz beträgt 0,6 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner und Jahr in

Frankreich und Tunesien (Bastuji-Garin *et al.*, 1995). Der auch als Blasensucht bezeichnete **Pemphigus vulgaris (PV)** manifestiert sich meistens an den Schleimhäuten, initial an der Mundschleimhaut. Charakteristisch sind zu Beginn der Erkrankung nach kurzer Zeit platzende Blasen, die leicht blutende, schmerzhaft Erosionen hinterlassen. Anschließend breiten sich schlaffe, mit klarem Inhalt gefüllte Blasen über das gesamte Integument aus. Durch Konfluenz mehrerer Blasen können große Hautgebiete betroffen sein. Der PV zeichnet sich serologisch durch Autoantikörper gegen Desmoglein (Dsg) 3, selten gegen Desmoglein (Dsg) 1, aus. Beim **Pemphigus foliaceus (PF)** (Abbildung 6) betrifft die Blasenbildung ausschließlich verhornende Haut (Eyre *et al.*, 1988, Hashimoto *et al.*, 1990, Koch *et al.*, 1990). Es treten aufgeplatzte Blasen, Erytheme, Krusten, Schuppen und Erosionen am gesamten Körper auf. Die Autoantikörper sind ausschließlich gegen Dsg1 gerichtet. Die Pemphigus-Erkrankungen **Paraneoplastischer Pemphigus** und **IgA-Pemphigus** sollen nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden.



*Abbildung 6: Erosionen und Krusten am Rücken eines Patienten mit Pemphigus foliaceus (aus Jainta et al., 2001)*

Eine weitere Gruppe unter den blasenbildenden Autoimmundermatosen stellen die **Pemphigoid-Erkrankungen** dar. Sie lassen sich unterteilen in das bullöse Pemphigoid, Pemphigoid gestationis, das Schleimhautpemphigoid (vernarbendes Pemphigoid) und die

Lineare IgA-Dermatose. Das **bullöse Pemphigoid (BP)** ist die häufigste subepidermal Blasen bildende Autoimmundermatose (Georgi *et al.*, 2001) mit einer jährlichen Inzidenz von 0,7 - 1,8 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner und Jahr in Frankreich und in Deutschland (Bernard *et al.*, 1995, Zillikens *et al.*, 1995). Sie steigt bei Menschen ab einem Alter von 60 Jahren deutlich an (Jainta *et al.*, 2001) und liegt bei den über 90-jährigen Männern in Deutschland bei mehr als 40 Neuerkrankungen pro Jahr (Jung *et al.*, 1999). Vor allem in feuchten Hautbereichen (Gesäß, Zehenzwischenräume, Achselhöhle), den Oberschenkelinnenseiten (Abbildung 7) und am Abdomen finden sich bei Patienten mit bullösem Pemphigoid stark juckende Blasen (Bernard *et al.*, 1995, Zillikens *et al.*, 1995, Schmidt *et al.*, 2000). Die Autoantikörper sind in der Regel gegen die NC16A-Domäne von BP180 und gegen BP230 gerichtet.



*Abbildung 7: Oberschenkel eines Patienten mit bullösem Pemphigoid mit prallen Blasen, Krusten und Erosionen (aus Jainta *et al.*, 2001).*

Beim **Schleimhautpemphigoid** (0,5 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner und Jahr) ist fast ausschließlich die Mucosa betroffen (Mutasim *et al.*, 1993). Offene Wunden in Mund-, Rachen- oder in der Speiseröhrenschleimhaut können Schluck-, Sprach-, Essstörungen als auch Tumorbildung zur Folge haben (Mutasim *et al.*, 1993). Ist zusätzlich die Bindehaut des Auges befallen, können Verwachsungen entstehen, durch die es zur Erblindung kommen kann

(Jainta *et al.*, 2001). Der Krankheitsverlauf ist meistens chronisch und schubartig. Bei einer von 7000 Schwangerschaften (Wever *et al.*, 1995) kommt es prä- oder postpartal zum Auftreten des **Pemphigoid gestationis (PG)**. Die Patientinnen haben ekzematöse, urtikarielle oder papulöse Hautveränderungen (Mutasim *et al.*, 1993, Wever *et al.*, 1995, Ogilvie *et al.*, 2000, Schumann *et al.*, 2000). Bei 5-10% kommt es zu einer Übertragung der Antikörper auf die Föten. Die Symptome bei diesem sind sehr schwach (Sitaru *et al.*, 2004), und die Krankheit klingt innerhalb weniger Wochen nach der Geburt ab. Bei gleicher Vaterschaft rezidiert das PG in den folgenden Schwangerschaften (Wever *et al.*, 1995). Die Autoantikörper sind nahezu ausschließlich gegen NC16A gerichtet (Giudice *et al.*, 1993, Murakami *et al.*, 1996, Perriard *et al.*, 1999). Selten treten Antikörper gegen BP230 auf (Morrison *et al.*, 1988, Messer *et al.*, 1993, Murakami *et al.*, 1996). Zu den charakteristischen Immunglobulinsubklassen zählen im Gegensatz zum bullösen Pemphigoid IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>3</sub> (Chimanovitch *et al.*, 1999). Die **lineare IgA-Dermatose** tritt unabhängig vom Alter auf und wird auch chronisch bullöse Dermatose des Kindesalters genannt (Chorzelski *et al.*, 1979, Zillikens *et al.*, 1999). Die Krankheit ist charakterisiert durch urtikarielle Plaques, Erytheme oder Blasen. Bei Erwachsenen sind häufig die Schleimhäute befallen (Wojnarowska *et al.*, 1988).

Die chronische **Epidermolysis bullosa acquisita** ist sehr selten und zeichnet sich durch Blasen und Erosionen an mechanisch beanspruchten Hautbereichen aus. Die Abheilung erfolgt unter Narben- und Milienbildung oder kann zu Nageldystrophie („Krümelnägel“) führen (Roenigk *et al.*, 1971).

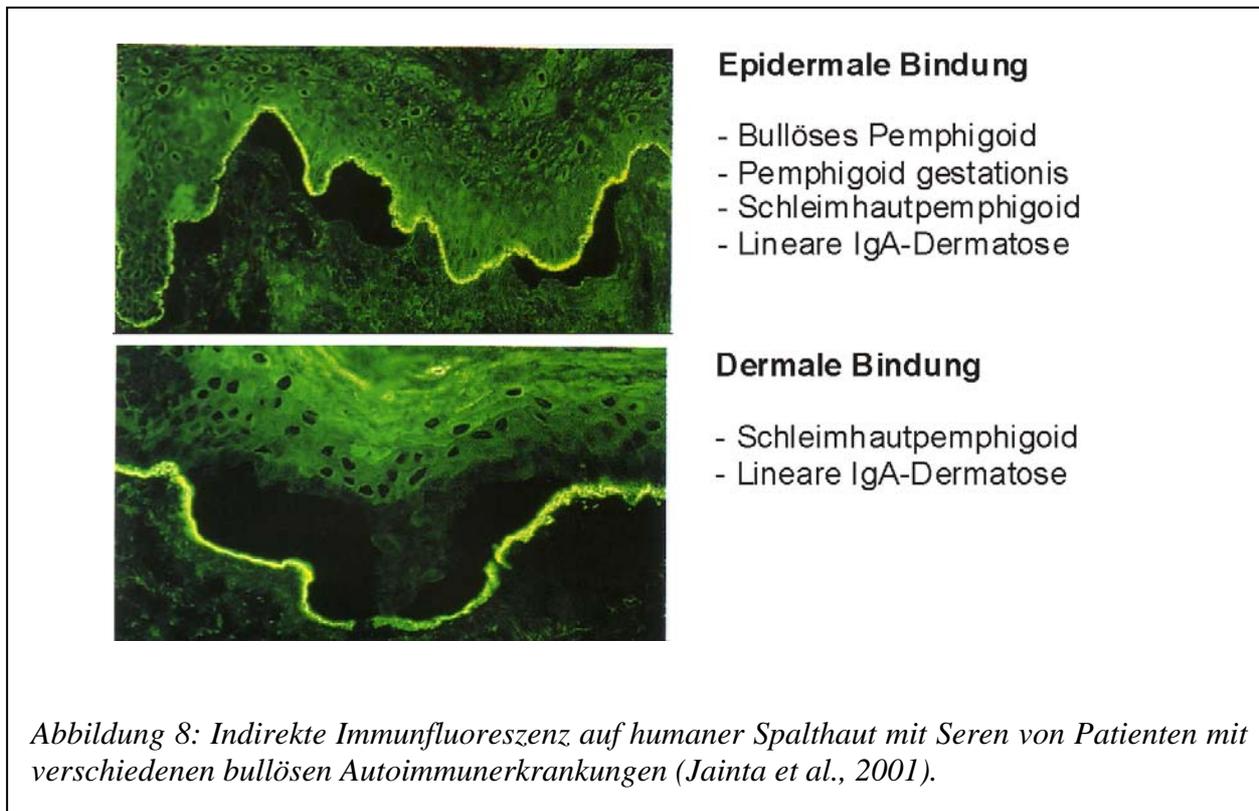
Vor allem in Nordeuropa und Ungarn werden häufig Fälle der **Dermatitis herpetiformis Duhring** beobachtet, die bei Menschen im frühen bis mittleren Erwachsenenalter auftritt. Klinisch ist die Krankheit durch gerötete Papeln an den Streckenseiten, selten durch Bläschen, gekennzeichnet (Reunala *et al.*, 1977, Fry *et al.*, 1995).

#### 1.4 Diagnose bullöser Autoimmundermatosen

Besteht klinisch und histologisch der Verdacht auf eine bullöse Autoimmundermatose, dienen die direkte (DIF) und die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) zur Sicherstellung der Diagnose. Für die **direkte Immunfluoreszenz** ist die Entnahme einer Blase mit ausreichend gesund

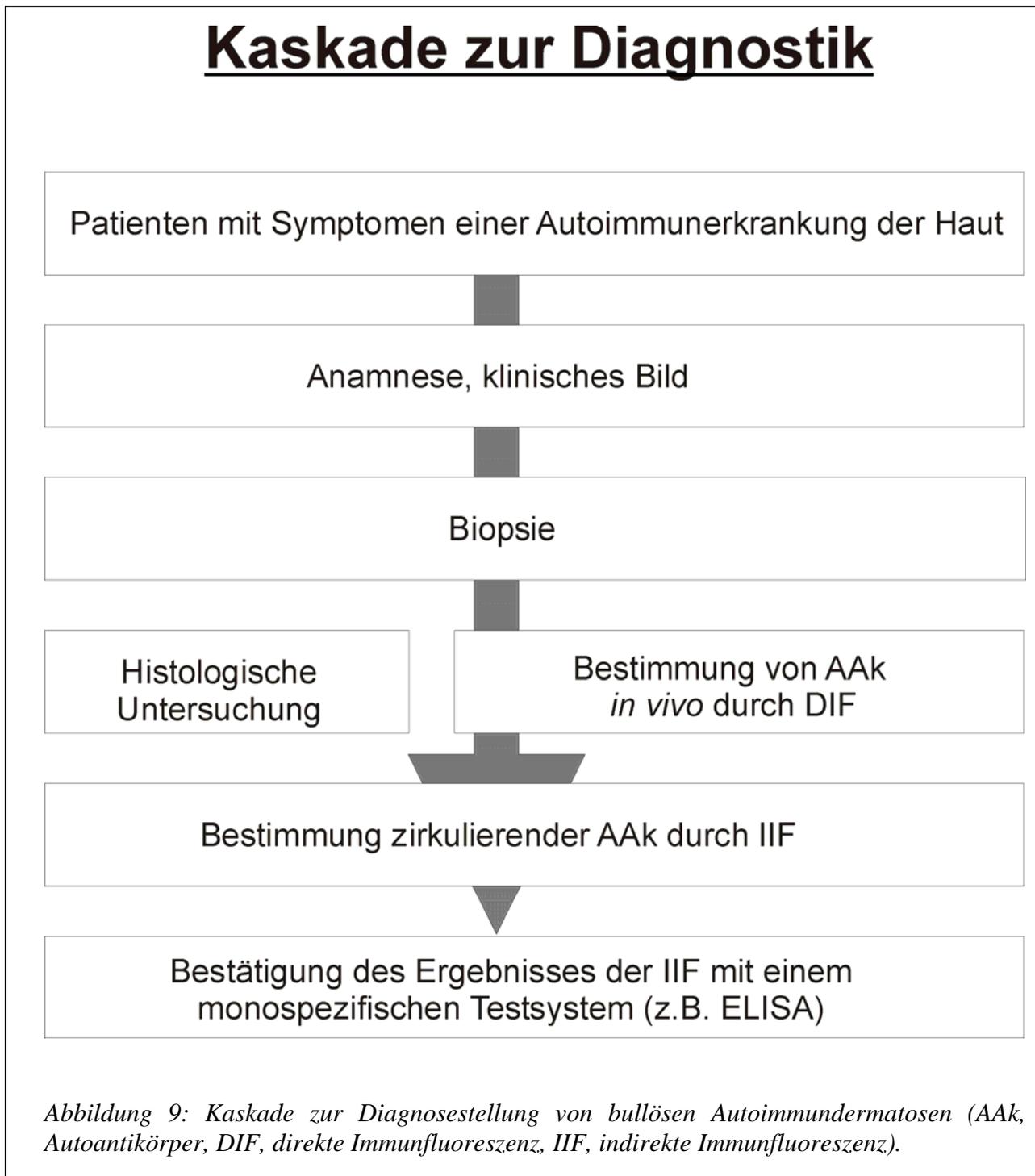
erscheinender Haut nötig. Charakteristisch ist eine Spaltbildung bei läsionaler Haut durch Verlust des Zell-Zell-Kontaktes. Es können Immunglobuline (IgG (79%), IgA (<20%) und IgM (<20%) zum Beispiel beim BP) und/oder Komplementfaktoren (C3 (94%)) an der dermo-epidermalen Junctionszone nachgewiesen werden (Kippes *et al.*, 1999).

Für die **indirekte Immunfluoreszenz** wird zum Nachweis zirkulierender Autoantikörper Ösophagus des Affen oder humane Spalthaut verwendet (salt split skin, SSS), bei der sich eine künstliche Blase (Spaltbildung) zwischen Epidermis und Dermis befindet (Scaletta *et al.*, 1978). Durch die Bindung zirkulierender Autoantikörper an unterschiedliche Zielstrukturen ergeben sich charakteristische Fluoreszenzmuster (Abbildung 8). Die Autoantikörper beim bullösen Pemphigoid binden z. B. an die epidermale Seite des Spaltes (Kippes *et al.*, 1999, Jainta *et al.*, 2001).



Finden sich Hinweise auf eine der dargestellten Erkrankungen, werden monospezifische Analyseverfahren, z. B. ein ELISA (Sitaru *et al.*, 2004), durchgeführt, die sich auch zur Titerkontrolle im Verlauf der Erkrankung eignen. Meistens wird dazu auf die rekombinante Form der NC16A-Domäne zurückgegriffen (Giudice *et al.*, 1994, Zillikens *et al.*, 1997, Haase *et al.*, 1998, Kobayashi *et al.*, 2002, Mariotti *et al.*, 2004). Kommerzielle Testsysteme sind von der EUROIMMUN AG (Sitaru *et al.*, 2007) und von der Firma MBL (Matritech GmbH,

Freiburg) (Kobayashi *et al.*, 2002) erhältlich. Auch ELISA mit rekombinant hergestelltem Desmoglein 1 und Desmoglein 3 stehen zur Verfügung. Abbildung 9 fasst die Schritte zur Diagnostik einer bullösen Autoimmundermatose zusammen.



## 1.5 Therapie bullöser Autoimmundermatosen

Bei leichten Verlaufsformen kann eine Linderung der Beschwerden mit Kortisonsalben erreicht werden. Um Sekundärinfektionen vorzubeugen, ist eine Behandlung mit Antibiotika mehrheitlich erforderlich. Liegt eine besondere Schwere der Krankheit vor, werden immunsuppressive Medikamente (z. B. Ciclosporin A) verabreicht und Therapieverfahren wie die Immunadsorption angewandt. Dabei werden Immunglobuline unabhängig von ihrer Spezifität aus dem Plasma gefiltert. Immunabsorptionsverfahren mit gereinigten Autoantigenen, mit Hilfe derer ausschließlich die krankmachenden Antikörper aus dem Blut entfernen werden, befinden sich zurzeit in der Entwicklung. Ihr Einsatz soll den Patienten zu einer rascheren Linderung der Symptome verhelfen. Darüber hinaus kann die Einnahmedauer von Immunsuppressiva reduziert werden, was zusätzlich zu einer Verringerung bzw. Vermeidung schwerwiegender Nebenwirkungen führt.

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Gegensatz zu BP180 sind die Epitope auf BP230, für die die Autoantikörper in Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid spezifisch sind, unzureichend charakterisiert. Mehrfach ist gezeigt worden, dass die für die Autoantikörperbindung relevanten Epitope vornehmlich im C-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert sind (z. B. Hamada *et al.*, 2001). Die Bedeutung konformationeller Epitope blieb dabei unberücksichtigt.

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand deshalb darin, die Grundgesamtheit der anti-BP230-Antikörper in einem BP-Serenkollektiv in einem unabhängigen Testsystem zu bestimmen. Dazu wurden die für die BP230-Voll-Länge und die beiden globulären Domänen kodierenden Sequenzabschnitte einzeln in einen Vektor kloniert und in Säugerzellen exprimiert. Die Proteine waren für die indirekte Immunfluoreszenz bestimmt. Dieses Testsystem war dazu geeignet, denn es ermöglichte eine möglichst authentische Präsentation der Proteine. Durch die parallele Messung von anti-BP230- und anti-BP180-NC16A-Autoantikörpern sollte die BP-Diagnostik verbessert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von unterschiedlichen kommerziellen Anbietern in der höchsten Reinheitsstufe bezogen.

### 2.2 Puffer und Lösungen

AU:	50 mM Natriumacetat pH 4,5, 8 M Urea
BCA-Lösung	Bicinchoninic acid (BCA) 1:50 in CuSO <sub>4</sub> -Lösung
BSA-PBS:	0,05% Tween-20, 0,5% BSA
Coomassie-Lösung:	400 mg/l Coomassie R 250, 10% (v/v) Eisessig, 40% (v/v) Methanol
Coomassie-Entfärbelösung:	10% (v/v) Eisessig, 40% (v/v) Methanol
7% Essigsäure:	7% (v/v) Eisessig, 93% (v/v) Wasser
Fixierlösung:	50% Methanol, 10 % Essigsäure
NuPage LDS Sample Buffer:	4x NuPage LDS Sample Buffer, 50 mM DTT
PBS1000-U:	50 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4, 8 M Urea, 1000 mM NaCl
PBS-U:	50 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4, 8 M Urea, 150 mM NaCl
PG4G:	10 mM NaPhosphat pH 7,4, 4 M Guanidinium-HCl, 10% (w/v) Glycerol
Ponceau-S-Lösung:	0,2% (w/v) Ponceau-S in 7% (v/v) Eisessig
TCA-Lösung	Trichloressigsäure 10% in A. dest.
10x TAE:	2 M Tris-Acetate, 0,05 M EDTA, pH 8,0
10x TBS-T:	0,2 M Tris, 1,5 M NaCl, 0,5% (v/v) Tween 20, pH 7,5
TNE:	5 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA
TNGGI-5:	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 6 M Guanidinium-HCl, 10% (v/v) Glycerin, 5 mM Imidazol
TNUGXI-5:	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 8 M Urea, 10% (v/v) Glycerin, 90 µM Genapol X-80, 5 mM Imidazol
TUI-5:	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 M Urea, 5 mM Imidazol

### 2.3 Kits

NucleoSpin Plasmid – Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

Nucleobond AX (NucleoBond PC100) – Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

NucleoSpin Extract II – Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

Rapid DNA Ligation Kit – Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

High Fidelity PCR Enzyme Mix – Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Taq DNA Polymerase – Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

dNTP Mix, 2 mM each – Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

### 2.4 Antikörper und Enzymkonjugate

Die in Tabelle 2 zusammengefassten Antikörper und Enzymkonjugate wurden von verschiedenen Anbietern bezogen.

*Tabelle 2: Zusammenfassung der verwendeten Antikörper und Enzymkonjugate (POD, Peroxydase; AP, Alkalische Phosphatase; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; WB, Westernblot; IFT, indirekter Immunfluoreszenz Test).*

Bezeichnung	Antigenspezifität	aus Spezies	Markierung	Verdünnung	
				WB	IFT
mo. anti-His-IgG	IgG	Maus	-	1:8000	1:200
poly. anti-BP230-Antikörper	IgG	Kaninchen	-	1:80	1:200
anti-human-IgG-AP	IgG	Ziege	AP	1:10	-
anti-human-IgG-POD	IgG	Ziege	POD	gebr.	-
anti-mouse-IgG-AP	IgG	Ziege	AP	1:2000	-
anti-mouse-IgG-FITC	IgG	Ziege	FITC	-	1:200
anti-human-IgG-FITC	IgG	Ziege	FITC	-	gebr.
anti-rabbit-IgG-FITC	IgG	Ziege	FITC	-	1:200
anti-rabbit-IgG-AP	IgG	Ziege	AP	1:2000	-

## 2.5 Seren

Die in dieser Arbeit verwendeten Seren sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Serenkollektive und deren Charakterisierung.

Nr.	Bezeichnung des Kollektivs	Anzahl der Seren	Charakterisierung
1	Bullöses-Pemphigoid-Kollektiv	49	Diagnose: bullöses Pemphigoid, Bindung von IgG und/oder C3 an die dermo-epidermale Junktionszone (DEJ) in der direkten Immunfluoreszenz , zirkulierende Antikörper (IgG) an der DEJ in der indirekten Immunfluoreszenz (Sitaru <i>et al.</i> , 2007).
2	Pemphigus-vulgaris-Kollektiv	16	Diagnose: PV
3	Pemphigoid-gestationis-Kollektiv	11	Diagnose: PG Nachweis von anti-BP180-Antikörpern im Anti-BP180-NC16A-4X-ELISA (EUROIMMUN AG).
4	Blutspender-Kollektiv 1	94	gesunde Blutspender (Lebensalter 25-30 Jahre), (Sitaru <i>et al.</i> , 2007)
5	Blutspender-Kollektiv 2	101	Seren von Patienten im Lebensalter über 70 Jahre mit nicht-inflammatorischen Autoimmunkrankheiten der Haut.
6	epidermale Basalmembran positive Seren	19	Referenzseren der EUROIMMUN AG. Nachweis von Antikörpern gegen epidermale Basalmembran im IFT. Verwendung nur für die Einstellung von Testsystemen. Keine Kenntnis über die Klinik der Patienten.

Die Serenkollektive (Nr. 1 - 4) wurden im Rahmen der Ethikanträge 04-143, 06-090 und 37-98 zusammengestellt.

## 2.6 Zellkulturmedien

### für die Zellkultur

DMEM High Glucose 4,5 g/l with L-Glucosamine – PAA Laboratories GmbH, Pasching

### für die Testexpression

DMEM High Glucose 4,5 g/l with L-Glucosamine – PAA Laboratories GmbH, Pasching

+ 10% FKS

+ 1% Penicillin/Streptomycin/Ciprofloxacin

+ 1% Amphotericin B

## 2.7 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme und Enzypuffer wurden von der Firma Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben verwendet.

## 2.8 cDNAs, DNA

DKFZp686C04183Q (Genbankzugriffsnummer BX475892) - imaGenes

IRAKp961A12140Q (Genbankzugriffsnummer BC065536) - imaGenes

HEK293 (genomische DNA) - ATCC® (Nr. CRL-1573™)

## 2.9 Vektoren

pET24d-N - Novagen

pET24d- Novagen

pTriEx-1- Novagen

Nähere Informationen können dem „System Manual“ (Novagen) entnommen werden.

## 2.10 Transformationsstamm (*E. coli*)

Die Zellen des Stammes *E. coli* Rosetta Blue(DE3)pLacI wurden als kompetente Zellen von der Firma Novagen (Katalog-Nummer 71060) bezogen.

## 2.11 Zelllinie

HEK293 (Graham *et al.*, 1977) - ATCC<sup>®</sup> (Nr. CRL-1573<sup>™</sup>)

## 2.12 Geräte und Verbrauchsmaterialien

### Geräte

Auf eine Zusammenstellung der verwendeten Geräte wird verzichtet, da an den entsprechenden Stellen die physikalischen Parameter der Bearbeitungsmethode beschrieben werden. So ist es möglich, die Experimente unabhängig vom Gerätetyp nachzuvollziehen.

### Verbrauchsmaterialien

Lab-Tek II Culture Slide<sup>™</sup> System – Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden

NiNTA-Superflow - Qiagen GmbH, Hilden

Nitrozellulosemembran - EUROIMMUN AG, Lübeck

NuPage Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1,0 mm, 2D well - Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Nunc-Immo LockWell Module MaxiSorp<sup>™</sup> - GmbH & Co. KG, Wiesbaden

Nylonmembran – EUROIMMUN AG, Lübeck

PE-Filter - Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

SPE-Säule - Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

### Sonstiges

Mark12 Unstained Standard – Invitrogen GmbH, Karlsruhe

MassRuler DNA Ladder, Mix – Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

MultiMark Multi-Colored Standard – Invitrogen GmbH, Karlsruhe

6x MassRuler Loading Dye Solution (Probenpuffer) – Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Novex Sharp Pre-stained – Invitrogen GmbH, Karlsruhe

## 2.13 Molekularbiologische Methoden

### 2.13.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der DNA-Amplifikation (Mullis *et al.*, 1990). Dazu werden Oligonukleotide verwendet (siehe 2.13.1.2), die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt der DNA-Vorlage (siehe 2.8) flankieren. Sie hybridisieren im 3'-Bereich mit dem Matrizenstrang und enthalten im 5'-Bereich Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme.

Für die Herstellung von DNA-Fragmenten zur Klonierung wird der High Fidelity PCR Enzyme Mix (siehe 2.3) nach Herstellerangaben verwendet. Der PCR-Ansatz setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

28,5 µl	A. dest.
5 µl	10 x High Fidelity PCR buffer with MgCl <sub>2</sub>
5 µl	2 mM dNTP (each)
5 µl	Senseprimer [10 µM]
5 µl	Antisenseprimer [10 µM]
1 µl	Template DNA (100 – 200 ng/µl)
0,5 µl	High-Fidelity PCR Enzyme Mix (5 U/µl)

Hat die PCR analytische Funktion, wird die Taq-Polymerase (siehe 2.3) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

9,5 µl	A. dest.
2 µl	10 x PCR buffer with (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1,6 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub> (final 2 mM)
2 µl	Senseprimer [10 µM]
2 µl	Antisenseprimer [10 µM]
0,4 µl	Template DNA (100 – 200 ng/µl)
0,5 µl	Taq-Polymerase (1 U/µl)

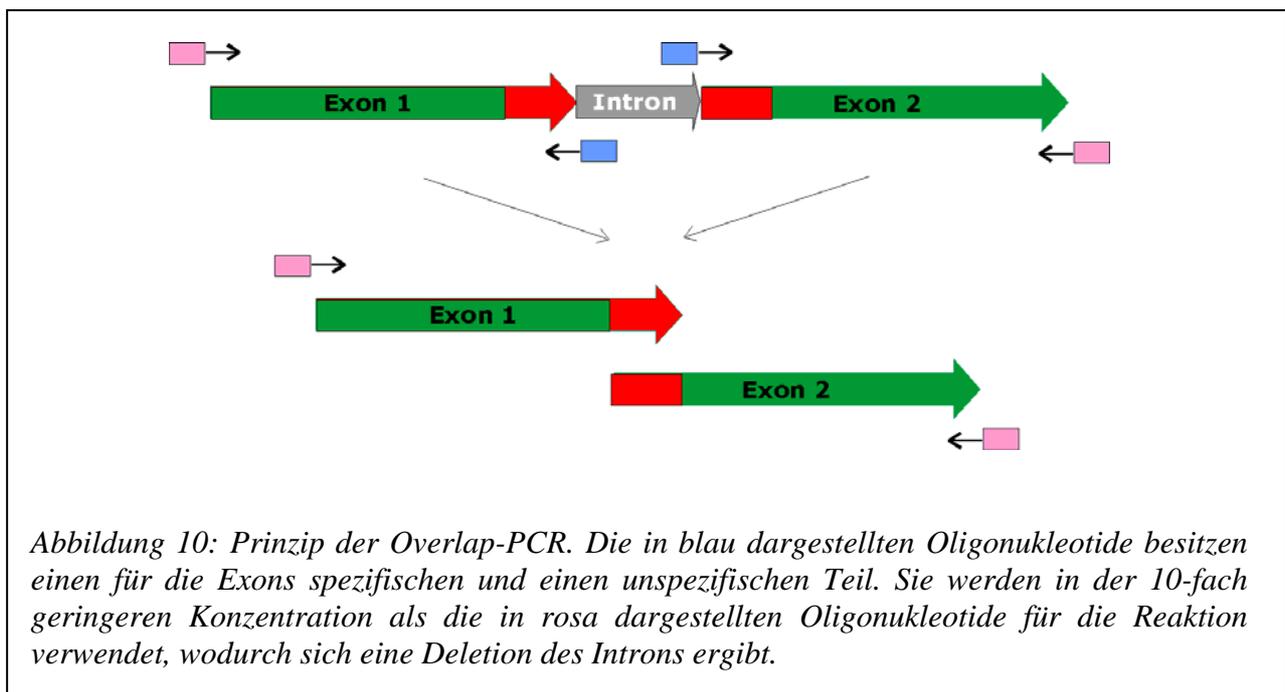
Die PCR erfolgt unter Einsatz von Standard-PCR-Protokollen (nach Herstellerangaben, Tabelle 4), für die die Polymerase-Reaktionszeit entsprechend der Näherung 1 kb/Minute berechnet wird. Die Oligonukleotide werden so gewählt, dass der Schmelzpunkt bei 56°C liegt.

Tabelle 4: Standard-PCR-Protokolle.

	Segment	Temperatur (°C)	Dauer	Anzahl der Zyklen
	High-Fidelity PCR Enzyme Mix	Denaturierung	94	30 sec
Primerhybridisierung		56	45 sec	
Amplifikation		68	(Größe in kb x 60 Sec)	
Denaturierung		94	30 sec	20
Primerhybridisierung		56	45 sec	
Amplifikation		68	(Größe in kb x 60 Sec)+10 sec/Zyklus	
		finale Elongation	68	10 min
Taq-Polymerase	Segment	Temperatur (°C)	Dauer	Anzahl der Zyklen
	Denaturierung	94	30 sec	30
	Primerhybridisierung	56	45 sec	
	Amplifikation	72	1 min	
		finale Elongation	68	10 min

### 2.13.1.1 Overlap-PCR

Die Overlap-PCR (Higuchi *et al.*, 1988) ist eine spezielle PCR-Technik, bei der eine Deletion innerhalb des Targets statt findet (Abbildung 10). Durch die Verwendung innerer Oligonukleotide (blau), die einen spezifischen und einen unspezifischen Teil haben, wird der dazwischen liegende Sequenzbereich (z. B. Intron) ausgeschlossen.



Indem äußere Oligonukleotide (rosa) in einer höheren Konzentration eingesetzt werden als die inneren entsteht ein zusammenhängendes Syntheseprodukt.

### 2.13.1.2 Oligonukleotide

Name	Sequenz
EP00273	TTTAAGCTTATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAG
EP00277	ATAGTCGACAGCTTCCTTTCGGGCTTTGTTAGC
EP01192	ATACGTCTCCCATGCAAGAGTTAAATAACAGG
EP01193	ATAGTCGACTAATAATGTTGTGACTTCTGTATG
EP01194	ATACCATGGATATGCATACAGAAG
EP01195	ATACTCGAGTAATACTACAGAAATTCTATG
EP01196	ATATCATGAGGAACATTTCCAATC
EP01197	ATACTCGAGTAAGGAAGAATAGTAGAGGC
EP01224	GCTTGTCTTAGCTATCTCTAAGGGTGTCAAAACCTTCACC
EP01225	GACTTCTGTATGCATATCATACTGCTTGTCTTAGCTATCTC
EP01226	ATAGTCGACTTATTTAATGTTGTGACTTCTGTATGCATATCATAAC
EP01625	ATACCATGGGCAGTAGTAGTTATAGTTACCGTAGCAG
EP01626	ATACTCGAGATTTTCTAGAAGTAGCTGCTCTGCTATC
EP01627	ATACCATGGTTCAGGAGATAGCAGAGCAGCTACTTCTAG
EP01628	ATACTCGAGTTTTACGAGGGCTTCTGCAGCTTGAG
EP01629	ATAACGTCTCCCATGGGCAAACTGTAACTTGGTGTAAAAAACACTC
EP01630	CTCCTCTCTTCCAGCCTCTTCAATGAATC
EP01631	GAAGAGGCTGGAAGAGGAGGAGATTAAAAGGTGTAAGGAGAC
EP01632	ATACTCGAGGTCTTTTTCCATCTGCTTTATCAGCTTCAAG
EP01633	ATACCATGGGTGAACTCTTGAAGCTGATAAAGCAGATG
EP01634	ATACTCGAGGTGTAATTCGTCTTGTACTTTTTTCAACC
EP01635	ATACCATGGGCCAAGAGTTAAATAACAGGTTGAAAAAAGTAC
EP01636	ATAGTCGACGGAAGAATAGTAGAGGCTAGAAATTCC
EP01719	AATTCCAGCCACCAGGGGCTCCACTC
EP01720	CATACTGCTTGTCTTAGCTATCTCTAAGGGTGTCAAAACCTTC
EP01721	GAGATAGCTAAGAACAAGCAGTATG
EP01722	CTTCTCTGCCTCAAGAAGCCTAATTCTG
EP01920	ATACTCGAGCAAAACACATTCATCGTCTTTGTAAATGG
EP01921	ATACCATGGCTATCTGTGACTACAGACAAATTGAG
EP01922	ATACTCGAGAAGTTCTTGATAATACTGCTTACATAAC
EP01923	ATACCATGGGCTCAGATATAACACAACCTGG
EP02215	ATATCGTCTCGAGTTTTACGAGGGCTTCTGCAGCTTG
EP02216	ATATCGTCTCAAACCTCTATGAACTAACTGTGTGAAGA
EP02217	ATACTCGAGCTCCTCTTCCAGCCTCTTCAATGAATCAC
EP02218	ATAGTCGACGCCATGGACTGTACCTTCAAACCAGATTTTGAG
EP02219	ATATCGTCTCTATCTCTAAGGGTGTCAAAACCTTCACC
EP02220	ATATCGTCTCAAGATAGCTAAGAACAAGCAGTATG
EP02221	ATATCGTCTCTAAGTGTAAATTCGTCTTGTACTTTTTTCAACCTG
EP02222	ATATCGTCTCCACTTAAAGACCATAGAGGAGCAGATGACC
EP02255	ATACTCGAGTTATAAGGAAGAATAGTAGAGGC
EP02256	ATATCGTCTCGAAGGTCAAAACACATTCATCGTCTTTGTAAATGG
EP02257	ATATCGTCTCACCTTCAAACCAGATTTTGAGATGAC
EP02258	ATATCGTCTCGAAGGTCTCCTCTTCCAGCCTCTTCAATGAATCAC

## 2.13.2 Klonierungsübersichten

### 2.13.2.1 Für das bakterielle System

In Abbildung 11 und 12 sind die Amplifikationsschemata der für die Teilsequenzen von BP230 codierenden Fragmente dargestellt, die für die Expression in Bakterienzellen vorgesehen waren.

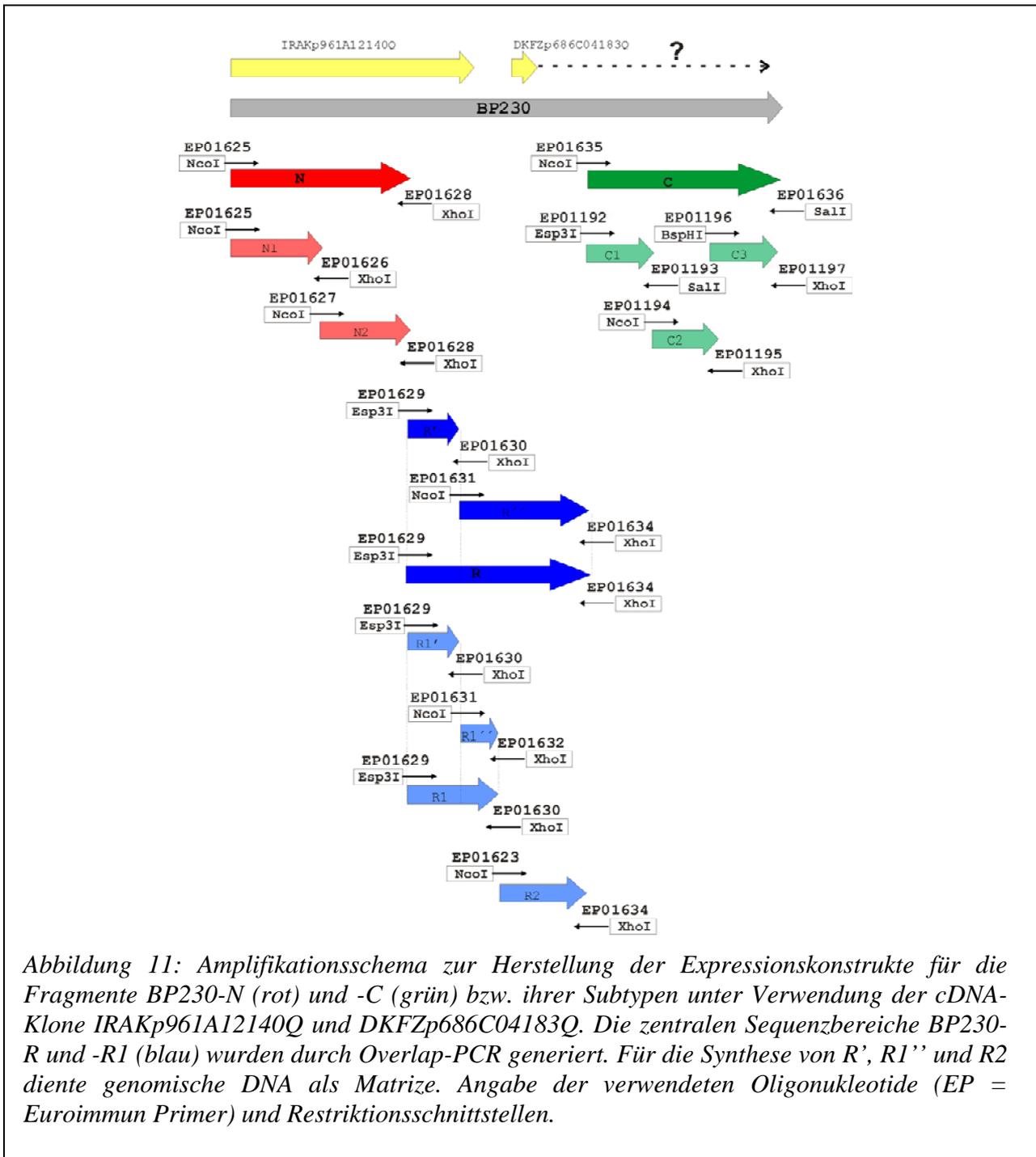


Abbildung 11: Amplifikationsschema zur Herstellung der Expressionskonstrukte für die Fragmente BP230-N (rot) und -C (grün) bzw. ihrer Subtypen unter Verwendung der cDNA-Klone IRAKp961A12140Q und DKFZp686C04183Q. Die zentralen Sequenzbereiche BP230-R und -R1 (blau) wurden durch Overlap-PCR generiert. Für die Synthese von R', R1'' und R2 diente genomische DNA als Matrize. Angabe der verwendeten Oligonukleotide (EP = Euroimmun Primer) und Restriktionsschnittstellen.

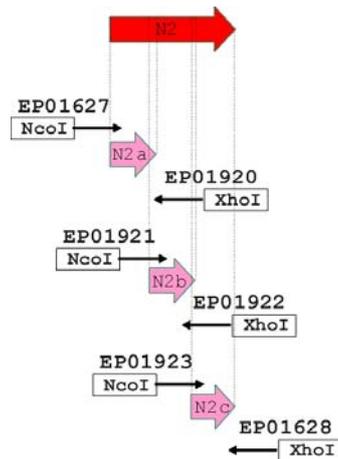


Abbildung 12: Amplifikationsschema von BP230-N2a, -N2b, -N2c. Darstellung der verwendeten Oligonukleotide (EP = Euroimmun Primer) und Restriktionsschnittstellen.

In Abbildung 13 und 14 sind die Amplifikationsschemata die zur Korrektur der Inserts der Plasmide pET24d-N-BP230-C[+23] und pET24d-N-BP230-C1[+23] dienen dargestellt.

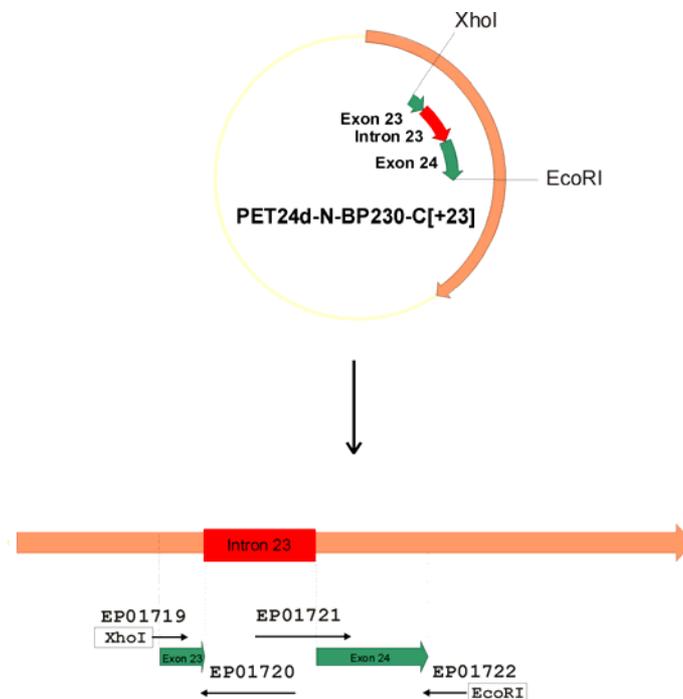


Abbildung 13: Amplifikationsschema eines Teilstücks des Inserts von pET24d-N-BP230-C[+23] (Insert in orange dargestellt) wurde über die Restriktionsenzyme XhoI und EcoRI geöffnet. Mithilfe der vier Oligonukleotide wurden die fehlenden Sequenzbereiche synthetisiert, durch Overlap-PCR zusammengesetzt und in den Vektor ligiert.

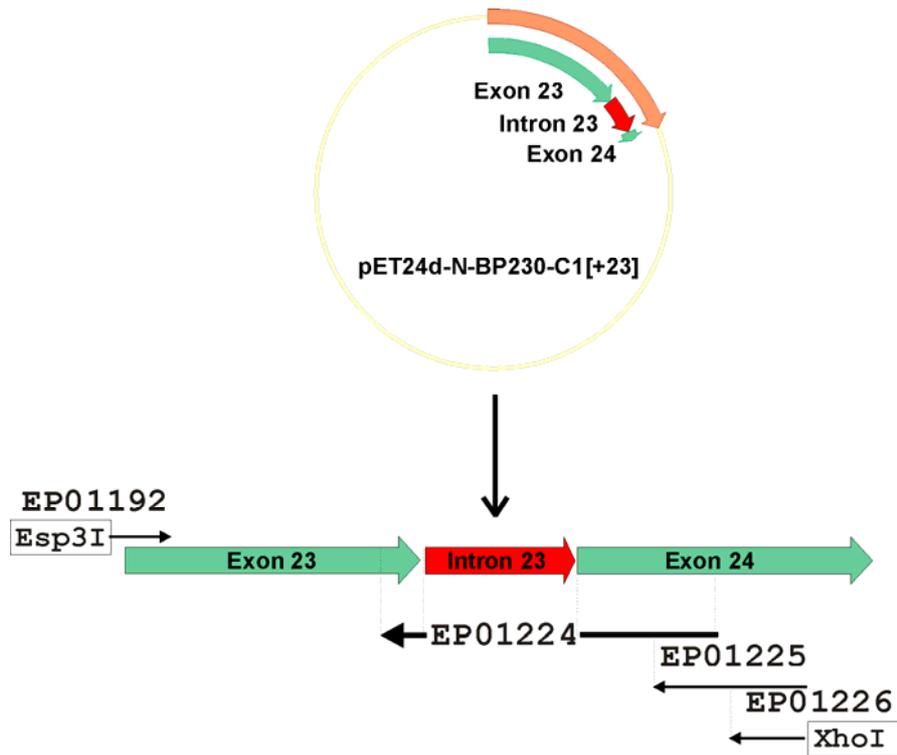
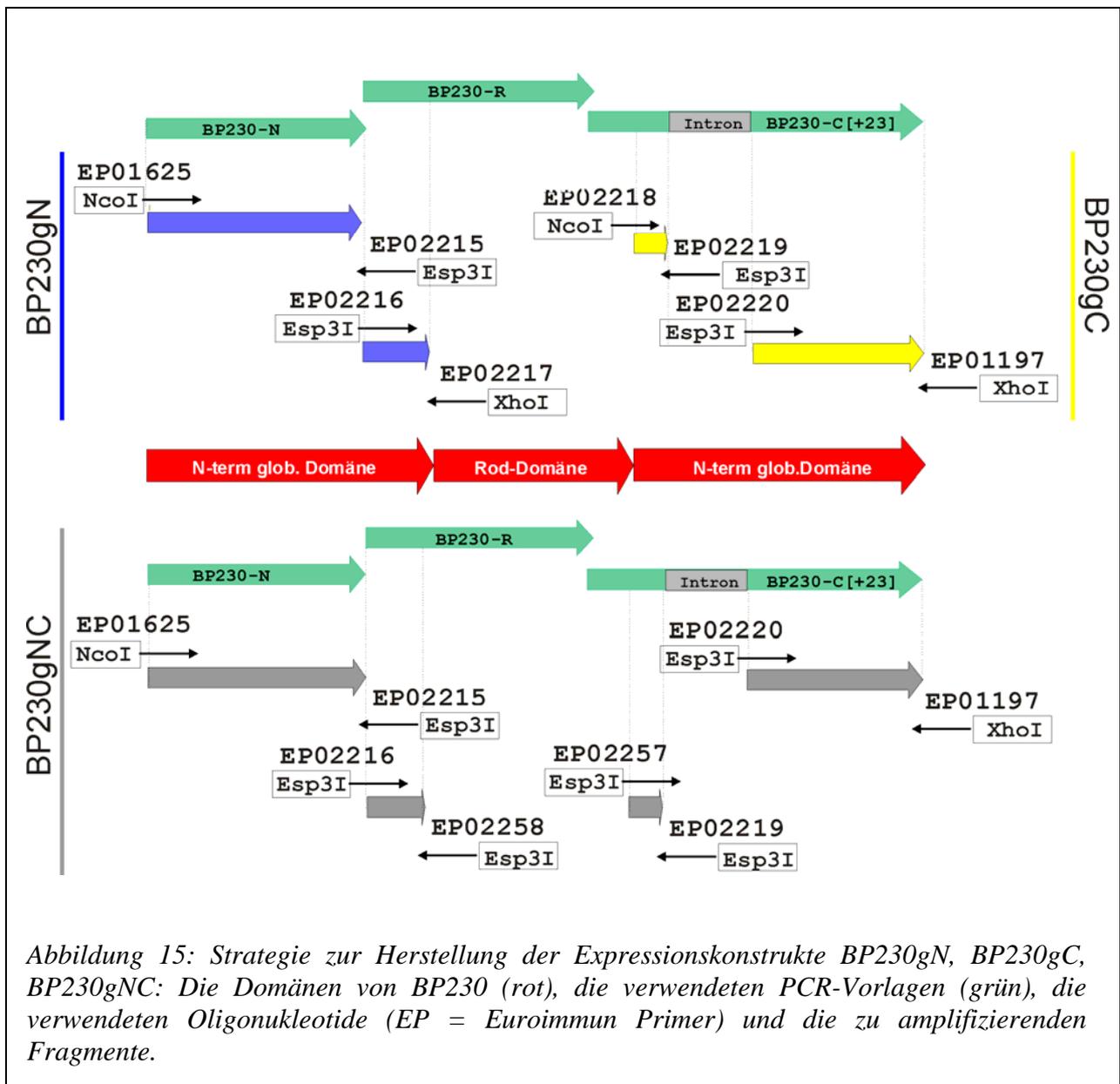


Abbildung 14: Amplifikationsschema zur Korrektur des Inserts von pET24d-N-BP230-C1[+23] unter Einsatz überlappender Oligonukleotide im 3'Bereich der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz.

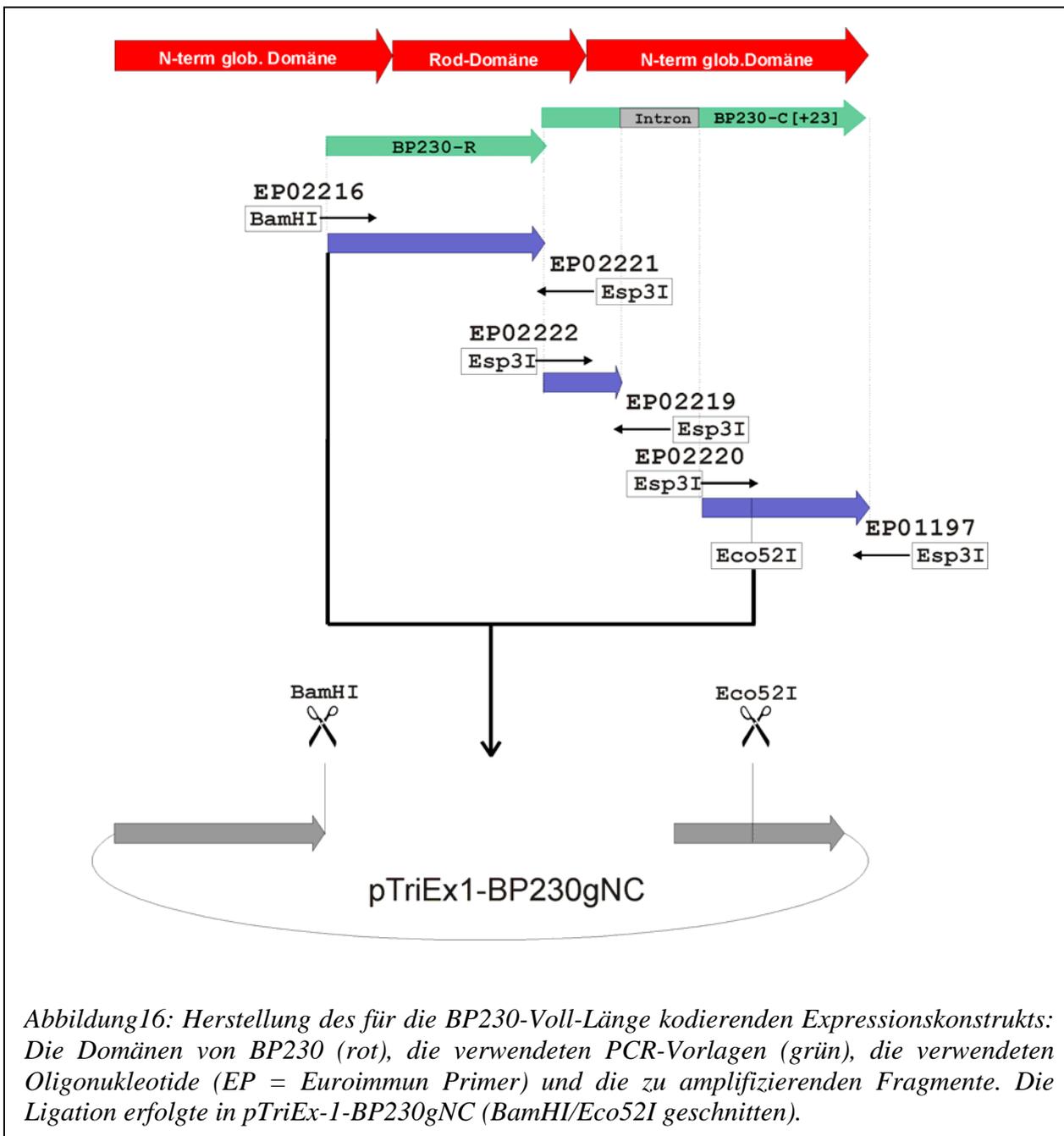
### 2.13.2.2 Für das eukaryotische System

Die Strategie für die Herstellung der codierenden Sequenzabschnitte, die für die Expression im eukaryotischen System vorgesehen waren, ist in Abbildung 15 und 16 zusammengefasst.



Zur Herstellung von BP230-Voll-Länge wurde das Plasmid pTriEx-1-BP230gNC durch Restriktion mit *Bam*HI und *Eco*52I linearisiert. Der für die Rod-Domäne kodierende Sequenzbereich wurde amplifiziert (Abbildung 16). Die Amplifikate wurden mit den entsprechenden Enzymen (siehe 2.13.3) restringiert und in den linearisierten Vektor pTriEx-1

(siehe 2.9) bzw. pTriEx-1-BP230gNC, der für die komplementären Schnittstellen kodierte, ligiert (siehe 2.13.5).



### 2.13.3 DNA-Restriktionsanalyse

Die Restriktionsanalyse erfolgt mit den an den entsprechenden Stellen angegebenen Restriktionsenzymen der Firma Fermentas nach Herstellerangaben.

#### 2.13.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente werden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Lottspeich *et al.*, 2006). Die dazu verwendeten Agarose-Gele im TAE-Puffersystem (siehe 2.2) besitzen verschiedene Massenanteile Agarose (angegeben in Prozent) und sind mit 1 µg/ml Ethidiumbromid (siehe 2.1) versetzt. Die Probe wird mit Probenpuffer (siehe 2.12) nach Herstellerangaben versehen. Die Auftrennung erfolgt bei einer Feldstärke von 5 bis 10 V/cm. Der Nachweis der DNA wird bei 320 nm (UV-Licht) erbracht.

#### 2.13.5 Ligation

Für die Ligation wird das „Rapid DNA Ligation Kit“ (siehe 2.3) nach Angaben des Herstellers verwendet. Sie dient zur Verknüpfung eines linearisierten Vektorfragments mit einem enzymatisch geschnittenen komplementären DNA-Fragment.

#### 2.13.6 Transformation von *E. coli*

Die Transformation beschreibt den Transfer von Plasmid-DNA in *E. coli*, der zu einer stabilen genetischen Veränderung führt.

Zum Ligationsansatz (siehe 2.13.5) werden 200 µl der kompetenten Zellen gegeben und 10 Minuten im Eisbad inkubiert. Sie werden für 45 Sekunden bei 42°C und 1 Minute im Eisbad inkubiert. Nach Zusatz von 800 µl LB-Medium (siehe 2.1) wird der Ansatz 30 Minuten bei 37°C geschüttelt (1000 rpm) und auf selektiven Agarplatten ausgestrichen. Je nach verwendetem Vektor werden Agarplatten mit verschiedenen Antibiotikazusätzen als Selektionsmarker bei 37°C für 12 Stunden inkubiert:

pET24d-N	Kanamycin/Chloramphenicol (50/34 µg/ml)
pET24d	Kanamycin/Chloramphenicol (50/34 µg/ml)
pTriEx-1	Ampicillin (100 µg/ml)

Mittels analytischer PCR (siehe 2.13.1) werden die Bakterien dahingehend geprüft, ob sie das richtige Insert enthalten. Dazu werden die Oligonukleotide so gewählt, dass sie an die DNA-Bereiche auf dem Vektor binden, die das Insert flankieren.

### **2.13.7 Plasmidisolation**

Mit Antibiotika (siehe 2.1) versetztes LB-Medium (siehe 2.1) wird mit einer Bakterienkolonie angeimpft und 24 Stunden bei 37°C inkubiert (1000 rpm). Die Plasmide werden nach Herstellerangaben (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, siehe 2.3) isoliert.

### **2.13.8 Testexpression**

Um zu kontrollieren, ob die rekombinant hergestellten Klone das gewünschte Protein exprimieren, wird eine Protein-Testexpression mit einer 3 ml Übernachtskultur (siehe 2.13.7) durchgeführt. Durch die Zugabe von 5 µl Induktionsmedium IPTG (0,4 M, siehe 2.1) wird die Bindungsstelle für die bakterielle RNA-Polymerase auf dem Promotor zugänglich, und die für das rekombinante Protein kodierende Sequenz kann abgelesen werden. Der Ansatz wird 3 Stunden bei 37°C inkubiert (1000 rpm). Die Absorption wird bei 600 nm gegen LB-Medium gemessen und als Zelldichteäquivalent angesehen. Das einer optischen Dichte (OD) von 0,5 entsprechende Kulturvolumen wird bei 21.000 x g für 5 Minuten bei 25°C zentrifugiert. Das Sediment wird in 66 µl TNUGXI-5 (siehe 2.2) sowie 34 µl NuPage LDS Sample Buffer (siehe 2.2) resuspendiert und ein Westernblot (siehe 2.15.5) durchgeführt.

### **2.13.9 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung der DNA wird von der Firma MWG Biotech AG in Ebersberg durchgeführt.

### **2.13.10 Anzucht von *E. coli* im präparativen Maßstab**

Ein Liter LB-Medium (siehe 2.1) wird mit einem Bakterienklon angeimpft und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert (120 rpm). Das Zelldichteäquivalent wird photometrisch bestimmt (siehe 2.13.8) und die Menge entsprechend einer OD von 0,75 bei 3000 rpm für 30 min zentrifugiert. Das Sediment wird in 2 Liter LB-Medium aufgenommen und 1 Stunde bei 37°C (4°C) inkubiert (120 rpm). Die Induktion der Proteinexpression erfolgt durch die Zugabe von 5 ml 0,4 M IPTG (siehe 2.1). Die Ansätze werden 3 Stunden inkubiert und 30 Minuten bei

3000 rpm (4°C) zentrifugiert. Das Sediment wird in 40 ml PBS (siehe 2.1) aufgenommen. Der Ansatz wird 30 Minuten zentrifugiert und das Sediment bei -20 °C bis zur Proteinaufreinigung gelagert.

### **2.13.11 Transfektion von Säugerzellen**

Die HEK293-Zellen (siehe 2.11) werden auf  $3 \times 10^5$ /ml Zellen in DMEM mit 10% FKS (siehe 2.6) eingestellt. Pro  $2 \text{ cm}^2$  einer Kultivierungsoberfläche werden 0,5 ml der Zellsuspension angezogen. Vier Stunden nach Aussaat erfolgt die Transfektion mit den Plasmiden und ExGen 500 (siehe 2.1) nach Herstellerangaben. Die transfizierten Zellen werden bei 37°C für 48 Stunden inkubiert.

Die Ausführung erfolgt z. B. in 24-well Näpfen zur Analytik der Proteine im Westernblot (siehe 2.15.5) oder auf Culture-Slides™ (siehe 2.15.7) für die IIF.

### **2.14 Herstellung eines polyklonalen anti-BP230-Antikörpers**

Der polyklonale Antikörper wurde von der Firma Eurogentec facilities (Seraing, Belgien) bezogen. Die Herstellung erfolgt nach einem 87-Tage Standard-Protokoll. Ein weißes New Zealand Kaninchen wird subkutan mit 200 µg rekombinantem humanen BP230-C1 Polypeptid immunisiert, welches in Freundschem Kompletmedium gelöst ist. Das Kaninchen wird an den Tagen 14, 28 und 56 mit derselben Antigenmenge immunisiert. Das Tier wird zum Ende des Protokolls ausgeblutet. Serum und zelluläre Bestandteile des Blutes werden durch Zentrifugation getrennt. Das Serum wird bei -20°C gelagert. Nicht immunisierte Kaninchenserum dienen als Negativkontrolle

## **2.15 Biochemische Methoden**

### **2.15.1 Proteinaufreinigung**

#### **2.15.1.1 Aufschluss der Bakterien und Präparation von Einschlusskörperchen**

Die Bakterien werden zuerst in 4 ml/g Feuchtgewicht TNE (siehe 2.2) aufgenommen. Durch die Zugabe von Lysozym (finale Konzentration: 0,2 mg/ml) (siehe 2.1) für 30 Minuten bei 25°C wird die Zellwand zerstört. Es werden MgCl<sub>2</sub> (finale Konzentration: 10 mM) (siehe 2.1) und Benzonase (finale Konzentration: 25 U/μl) (siehe 2.1) zugegeben. Die Suspension wird für 60 Minuten bei 37°C inkubiert, um Nukleinsäuren abzubauen. Der Zellaufschluss erfolgt durch zweimalige Passage in einem EmulsiFlex-C3 Hochdruck-Homogenisator (siehe 2.12) bei 1200 bar.

Zur Trennung der in Detergenzien löslichen und nicht löslichen Bestandteile wird das Homogenisat mit Triton X-100 (finale Konzentration: 12% (v/v), siehe 2.1) versetzt, 30 Minuten inkubiert und 20 Minuten bei 21.200 x g (4°C) zentrifugiert. Das Sediment wird in TNE (siehe 2.2) aufgenommen, zentrifugiert (21.200 x g, 4°C) und in A. dest. resuspendiert.

#### **2.15.1.2 Isolation von Einschlusskörperchen aus *E. coli***

Zur Bestimmung des Extraktionsvolumens wird eine BCA-Proteinbestimmung (siehe 2.15.1.5) der Einschlusskörperchen-Suspension durchgeführt. Dazu wird ein 200 μl Aliquot der Suspension durch Zentrifugation (20.000 x g, 4°C) und Extraktion des Sediments mit TNGGI-5 und erneuter Zentrifugation zur Sedimentation unlöslicher Bestandteile in Lösung überführt.

Der Hauptteil der Suspension wird anschließend auf eine Proteinkonzentration von 2,5 mg/ml eingestellt, mit 1 Volumen (gemessen am Gesamtvolumen) Isopropanol (siehe 2.1) versetzt und bei 2800 x g für 10 Minuten (25°C) zentrifugiert. Zum Herauslösen der Lipide wird das Sediment in 1 Volumen 2:1 Chloroform/Methanol (siehe 2.1) resuspendiert und zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Chloroformreste in einem Waschschrift mit Isopropanol entfernt. Das Sediment wird zweimal bei 56°C in je 1 Volumen TNGGI-5 (siehe 2.2) für 10 Minuten extrahiert, zentrifugiert und in TNGGI-5 resuspendiert. Alle Fraktionen werden auf einem SDS-Polyacrylamidgel (siehe 2.15.3) aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung (siehe 2.15.4) gefärbt.

### **2.15.1.3 Immobilisierte Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)**

Das Prinzip der IMAC beruht auf der spezifischen, reversiblen Bindung eines Proteins an ein Metallion (hier Nickel), das über einen Liganden (hier Nitrilotriessigsäure, NTA) an eine Trägermatrix (hier Agarose) gebunden ist.

Pro 1 ml aufzureinigender Proteinlösung werden 0,25 ml NiNTA-Superflow (siehe 2.12) in eine SPE-Säule mit PE-Filter (Macherey-Nagel, siehe 2.12) gegeben, die über einen Luer-Lock-Dreiwegehahn auf eine Vakuumabsaugvorrichtung montiert ist. Das Fassungsvermögen der Säule ist definiert als ein Matrixvolumen. Die Säule wird zweimal mit dem zweifachen Matrixvolumen TNGGI-5 (siehe 2.2) equilibriert. Die Proteinlösung wird auf die Säule gegeben und 10 Minuten inkubiert. Die Säule wird mit dem zweifachen Matrixvolumen TUI (siehe 2.2) sechsmal gewaschen. Die Proteine werden durch viermalige Zugabe eines Matrixvolumens AU (siehe 2.2) eluiert. Abschließend erfolgt die Überprüfung der Reinheit durch einen Westernblot (siehe 2.15.5).

### **2.15.1.4 Kationenaustausch-Chromatographie**

Bei der Kationenaustausch-Chromatographie werden positiv geladene Moleküle (hier Proteine bei pH 4,5 mit einem isoelektrischen Punkt  $<4,5$ ) an eine negativ geladene Trägermatrix (hier ein Sulfonsäure-Derivat an Agarose) gebunden und von negativ geladenen Molekülen (hier z. B. Nukleinsäuren, Proteine und Lipopolysaccharid) abgetrennt. Die Elution erfolgt durch Anhebung der Leitfähigkeit und/oder des pH-Wertes.

Eine mit 0,04 ml S-Sepharose (siehe 2.1) pro 1 ml Proteinlösung befüllte Säule wird zweimal mit dem doppelten Matrixvolumen (siehe) AU für 1 Minute equilibriert. Die Eluate (siehe 2.15.1.3) werden auf die Säule aufgetragen und 10 Minuten inkubiert. Es folgen 2 Waschschrte mit dem doppelten Matrixvolumen mit AU (siehe 2.2). Unter dreimaliger Zugabe des einfachen Matrixvolumens PBS1000-U (siehe 2.2) werden die Proteine eluiert. Die Analyse der Proben erfolgt mittels Westernblot (siehe 2.15.5).

### 2.15.1.5 Proteinkonzentrations-Bestimmung (BCA)

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wird ein BCA-Test durchgeführt. Dabei nutzt man die Eigenschaft, dass Proteine mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex eingehen und zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert werden. Die  $\text{Cu}^+$ -Ionen bilden mit Bicinchonin-Säure (BCA) einen violetten Komplex, der bei 570 nm photometrisch quantifiziert wird.

Zu 20  $\mu\text{l}$  Probe bzw. Proteinstandard (BSA-PBS, siehe 2.2) werden 200  $\mu\text{l}$  BCA-Lösung (siehe 2.2) zugegeben. Es erfolgt eine 30-minütige Inkubation bei 37°C. Die Extinktion wird bei 570 nm bestimmt und der Proteingehalt berechnet.

### 2.15.1.6 TCA-Fällung

Zur Vorbereitung von Proben für die SDS-PAGE-Analytik werden 50  $\mu\text{l}$  einer Fraktion mit 200  $\mu\text{l}$  10% (w/v) TCA (siehe 2.2) vermischt, 20 Minuten auf Eis inkubiert und 15 Minuten bei 20.000 x g (4°C) zentrifugiert. Dadurch werden die enthaltenen Proteine ausgefällt. Das Sediment wird mit Aceton gewaschen und nach Zentrifugation in 240  $\mu\text{l}$  PBS-U (siehe 2.2) solubilisiert. Die Endfraktion kann für die SDS-PAGE (siehe 2.15.3) eingesetzt werden.

### 2.15.1.7 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde in Zusammenarbeit mit dem Proteomzentrum in Rostock durchgeführt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete massenspektrometrische Methode wird als MALDI-TOF fingerprinting bezeichnet („matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight spectrometry“) und geht auf Karas und Hillenkamp (1988) zurück. Dazu werden die zu untersuchenden Proteingemische in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine werden nach einer geeigneten direkten Anfärbung (hier mit Coomassie Brilliant Blue G250) aus dem Gel isoliert, mit Trypsin verdaut und zusammen mit einer Matrix auf einem Metallträger, der gleichzeitig als Elektrode dient, kristallisiert. Die Probe wird anschließend im Vakuum mit einem Laser bestrahlt, wodurch die ionischen Peptide von der Oberfläche abgelöst werden und durch das angelegte Hochspannungsfeld in Richtung des Detektors beschleunigt werden. Dabei ist die Flugzeit abhängig von Masse und Ladung. Anhand der ermittelten Flugzeiten und eines Vergleichs mit den Flugzeiten von Referenzpeptiden können zunächst Masse/Ladungsverhältnisse (m/z) der Peptide aus der

Probe ermittelt werden. Anschließend werden diese Daten für einen statistischen Vergleich mit einer Sequenzdatenbank benutzt, die durch einen tryptischen *in silico* Verdau erzeugt wurde. Eine molekulare Identifikation gilt als signifikant, wenn ein Schwellenwert für die Übereinstimmung des gemessenen mit dem theoretischen Massenprofil überschritten wird (Alberts *et al.*, 2004).

### **2.15.2 Enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA)**

1971 ist der ELISA erstmals von Avrameas und Guilbert sowie von Engvall und Perlman beschrieben worden und kann zum Nachweis von Antikörpern in einer Probe dienen.

Eine 96-well Mikrotiter-Platte (siehe 2.12) wird mit 100 µl einer definierten Antigenverdünnung in ELISA-Beschichtungspuffer (EUROIMMUN AG) für 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wird die Platte mit 200 µl ELISA-Blockierungspuffer je Napf (EUROIMMUN AG) für 2 Stunden blockiert. Die Durchführung des ELISA erfolgt mit Reagenzien der EUROIMMUN AG gemäß einem Standard-Protokoll.

### **2.15.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Bei einer SDS-PAGE werden Proteine nach ihrer Masse und unabhängig von ihrer Ladung aufgetrennt (Ornstein *et al.*, 1964).

Die Proben werden mit NuPage LDS Sample Buffer (siehe 2.1) versetzt und 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Für die Durchführung einer SDS-Page wird die Apparatur von Invitrogen XCell Sure Lock NOVEX (siehe 2.12) eingesetzt. Es werden 4-12% Bis-Tris-Gele (1,0 mm x 2D well) im MES-Puffersystem von Invitrogen (siehe 2.12) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die apparenten molekularen Massen der Proteine lassen sich relativ zu einem Protein-Marker ableiten.

#### **2.15.4 Coomassie-Färbung**

Die Coomassie-Färbung beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue R 250 an aromatische und basische Aminosäurereste.

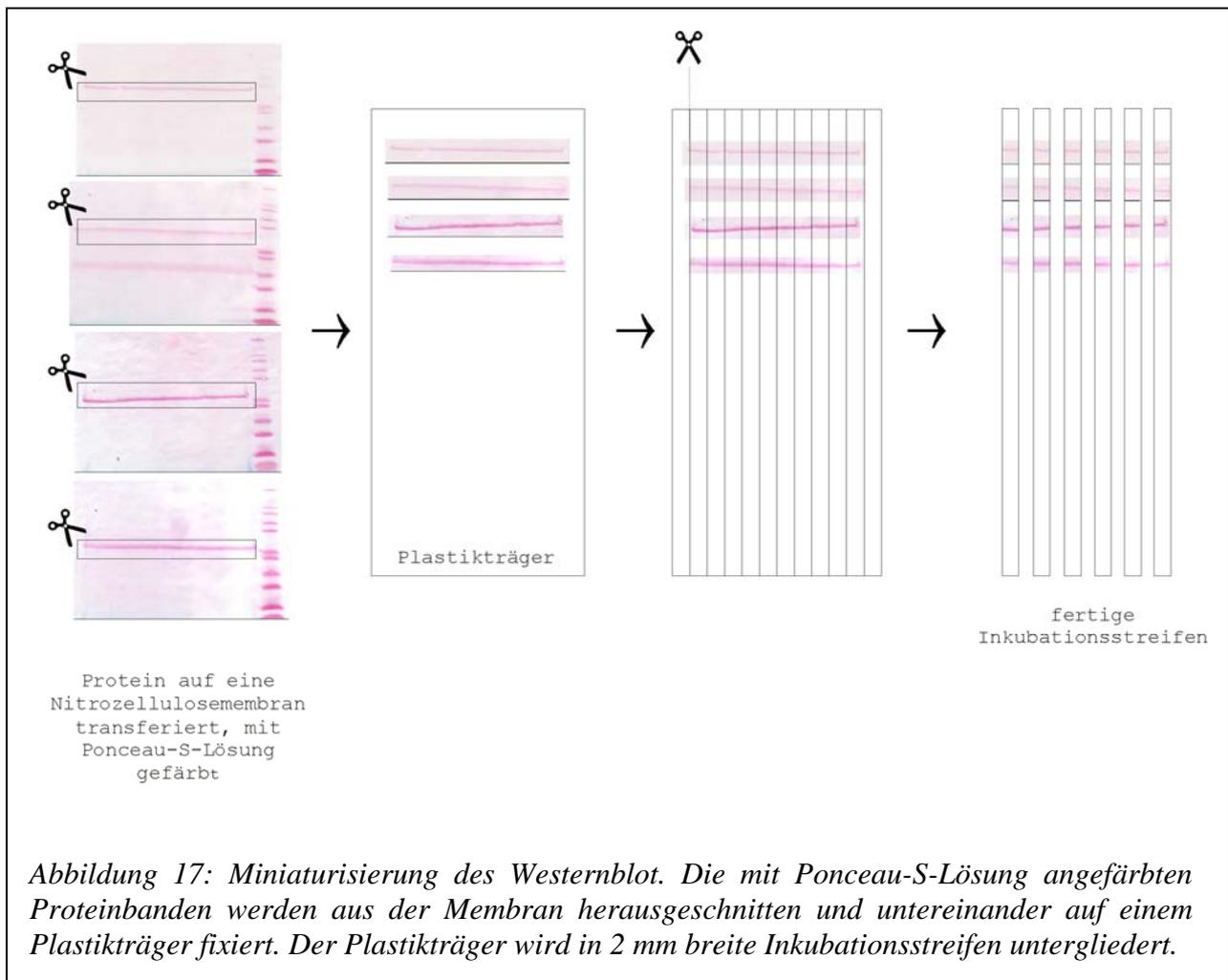
Das SDS-Polyacrylamidgel (siehe 2.15.3) wird 30 Minuten in Coomassie-Lösung (siehe 2.2) und anschließend in Coomassie-Entfärbelösung (siehe 2.2) inkubiert. Dadurch treten blaue Proteinbanden hervor.

#### **2.15.5 Proteintransfer auf eine Membran (Westernblot)**

Die im SDS-Polyacrylamidgel (siehe 2.14.3) elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden auf eine Trägermembran (Nitrozellulose, siehe 2.12) transferiert (Renart *et al.*, 1979). Der Proteintransfer erfolgt in einer Tank-Blot-Kammer (Hoefer Inc.) mit NuPage Transfer Buffer (Invitrogen, siehe 2.1) für 60 Minuten bei 400 mA.

##### **2.15.5.1 Miniaturisierung des Westernblot**

Zur Herstellung der Inkubationsstreifen wird ein Westernblot (siehe 2.15.5) durchgeführt. Durch Ponceau-S-Färbung (siehe 2.15.6.1) werden die das Zielprotein enthaltenen Membranregionen angefärbt, mit flankierenden Bereichen minimaler Länge ausgeschnitten und untereinander auf einem Plastikträger fixiert. Dieser wird in 2 mm breite Inkubationsstreifen unterteilt (Abbildung 17).



## 2.15.6 Immunchemischer Nachweis

### 2.15.6.1 Ponceau-S-Färbung

Der anionische Farbstoff Ponceau-S bindet reversibel protonierte Proteine. Dazu wird die Membran 5 Minuten in Ponceau-S-Lösung (siehe 2.2) inkubiert. Der ungebundene Farbstoff wird mit 7% (v/v) Essigsäure (siehe 2.1) und 50 mM Tris-Base (ohne pH-Einstellung) (siehe 2.1) entfärbt.

### 2.15.6.2 Immunmarkierung

Die Membranstreifen werden in 1500 µl Universalpuffer Plus (EUROIMMUN AG) für 15 Minuten blockiert. Die Seruminkubation in Universalpuffer plus (1:200) erfolgt über Nacht

(12 Stunden). Die weitere Vorschrift zur Abarbeitung entspricht dem Standard-Protokoll der EUROIMMUN AG.

### 2.15.7 Indirekter Immunfluoreszenz Test (IFT)

Die Bestückung der Objektträger erfolgt nach einem von der EUROIMMUN AG entwickelten Verfahren. Bei der Biochip-Technologie (Patent-Nr: PCT/EP/2005/000974) werden z. B. wie in Abbildung 11 sechs verschiedene Substrate (Gewebe, Proteine oder Zellen) auf einem Inkubationsfeld kombiniert, die dann in einem Arbeitsschritt mit einem Patientenserum inkubiert werden. Dadurch ist es möglich, mit möglichst geringem Zeit- und Materialaufwand zu einem Befund zu kommen, der sich wie in diesem Fall aus sechs Einzelbefunden zusammensetzt (Abbildung 18).

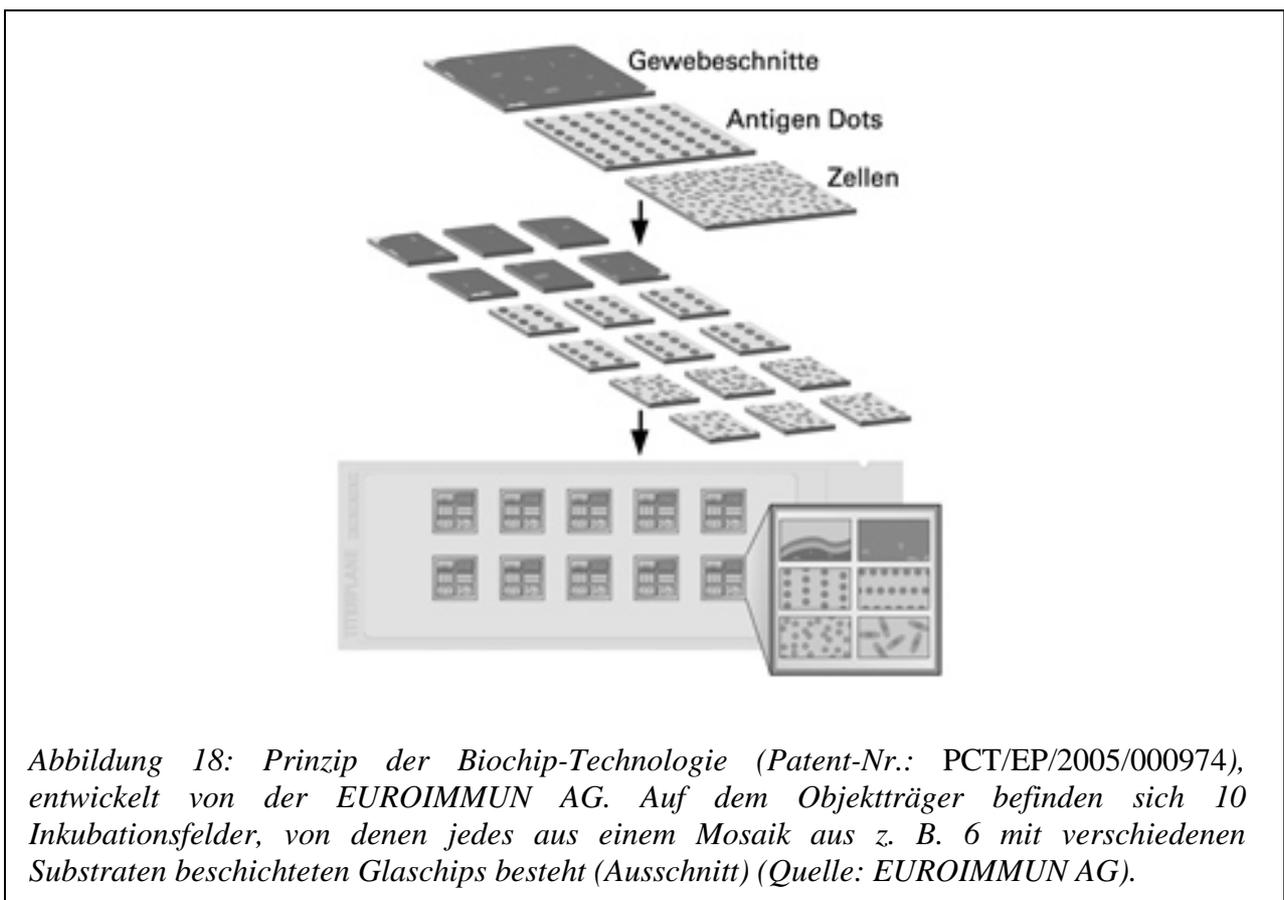


Abbildung 18: Prinzip der Biochip-Technologie (Patent-Nr.: PCT/EP/2005/000974), entwickelt von der EUROIMMUN AG. Auf dem Objektträger befinden sich 10 Inkubationsfelder, von denen jedes aus einem Mosaik aus z. B. 6 mit verschiedenen Substraten beschichteten Glaschips besteht (Ausschnitt) (Quelle: EUROIMMUN AG).

Die Fixierung der Zellen auf den Objektträgern erfolgt für 10 Minuten in Aceton (siehe 2.1). Die weitere Inkubation und Auswertung erfolgt mit Reagenzien der EUROIMMUN AG nach einem Standard-Protokoll z. B. des „Dermatologie-Mosaiks 9“.

## **3 Ergebnisse**

Zur Messung der Grundgesamtheit der anti-BP230-Antikörper in einem BP-Serenkollektiv wurden das BP230-Voll-Längen-Protein und seine Proteindomänen einzeln in Säugerzellen exprimiert. Als Nachweis-System für die Antikörperbindung an diese Epitope wurde der indirekte Immunfluoreszenz Test (IFT) gewählt. Um nahezu physiologische Bedingungen für die Polypeptidanalyse zu gewährleisten, wurde auf denaturierende Reagenzien verzichtet. Zusätzlich wurden die Reaktionen gegen die Wirtszelle, einer humanen Zelle, minimiert. Des Weiteren wurde zur optimalen diagnostischen Anwendung eine Miniaturisierung der Reaktionsansätze durchgeführt.

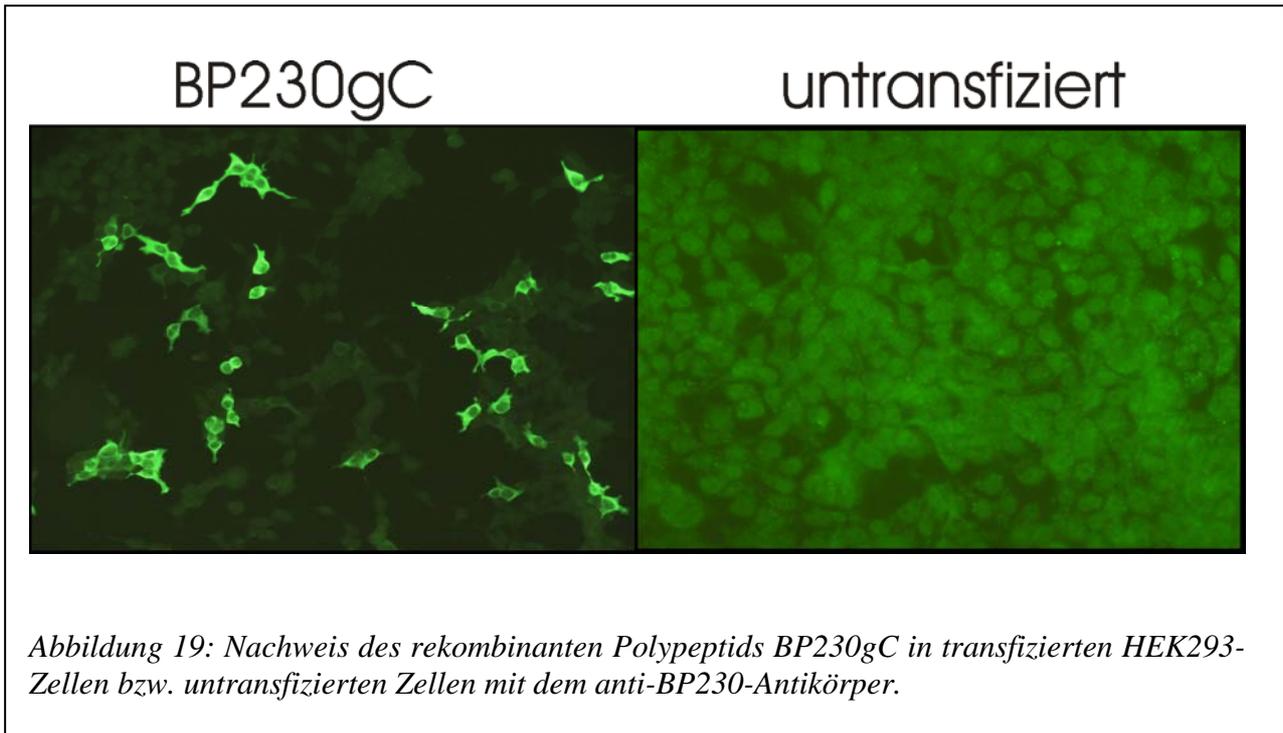
### **3.1 Herstellung der Expressionskonstrukte (eukaryotisches System)**

#### **3.1.1 DNA-Klonierungsarbeiten**

Um das Protein BP230 hinsichtlich seiner linearen und konformationellen Epitope zu analysieren, wurden 4 rekombinante Polypeptide in Säugerzellen exprimiert. Dabei handelte es sich um die BP230-Voll-Länge, die N-terminale globuläre Domäne (BP230gN), die C-terminale globuläre Domäne (BP230gC) und ein Fusionskonstrukt aus diesen beiden Domänen (BP230gNC), welches ein Zwischenfragment zur Klonierung des BP230-Voll-Längenkonstrukts sein sollte und in der Studie nicht verwendet wurde. Die Strategien zur Konstruktion der Expressionskonstrukte von der BP230-Voll-Länge, BP230gN, -gC und -gNC sind in Kapitel 2.13.2.2 dargestellt. Für die rekombinante Genexpression (siehe 2.13.11) wurden HEK293-Zellen verwendet (siehe 2.11).

#### **3.1.2 Testexpression**

Der Nachweis der Funktionalität der Polypeptide konnte in der indirekten Immunfluoreszenz (siehe 2.15.7) unter Verwendung von transfizierten HEK293-Zellen als Substrat erbracht werden, was beispielhaft für pTriEx-1-BP230gC dargestellt ist (Abbildung 19). Das Substrat wurde mit einem polyklonalen anti-BP230-Antikörper inkubiert (siehe 2.14) und mit Hilfe eines anti-rabbit-IgG-FITC Konjugats nachgewiesen.



### 3.1.3 DNA-Sequenzierung

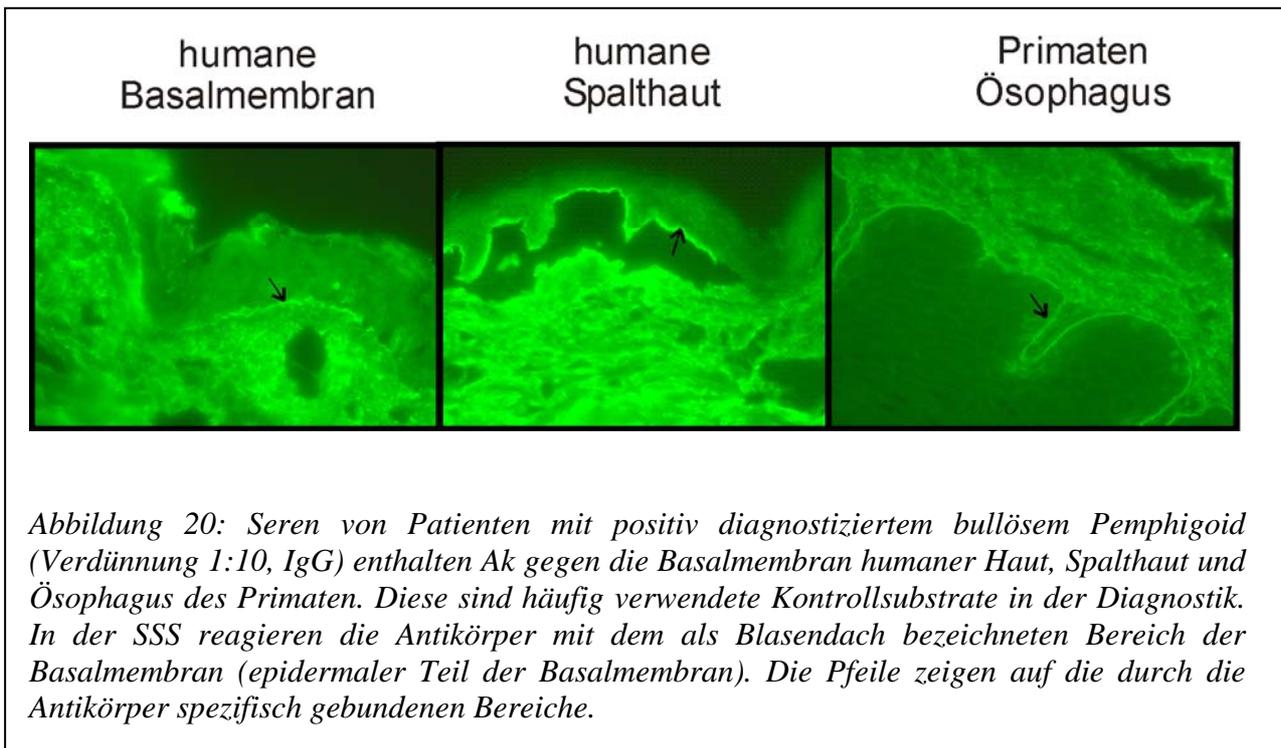
Die für die Proteine kodierenden, funktionell erscheinenden Sequenzbereiche wurden sequenziert (siehe 2.13.9). Anhand eines Abgleichs mit der Referenzsequenz (Genbankzugriffsnummer M69225) durch die Software „ClustalW2“ konnte eine 100%-tige Übereinstimmung gezeigt werden.

## 3.2 Analyse relevanter Epitope auf BP230 beim bullösen Pemphigoid

Für die Durchführung einer Studie wurden HEK293-Zellen auf Deckgläsern angezogen und mit den Plasmiden transfiziert, die die für die Teilstücke bzw. die Voll-Länge von BP230 kodierenden Sequenzabschnitte enthielten (siehe 2.13.11). Die Herstellung der Biochips ist in 2.15.7 beschrieben.

Die Inkubation (siehe 2.15.7) mit den unverdünnten Seren aus dem BP-Kollektiv (siehe 2.5) erfolgte in zwei Verdünnungsstufen (1:10 und 1:100). Die Seren des Kollektivs „Blutspender 1“ (n = 94) wurden 1:10 verdünnt und dann verwendet. Nachgewiesen wurden Immunglobuline der Klasse IgG (alle Subtypen). Um eine mit externen Studien vergleichbare

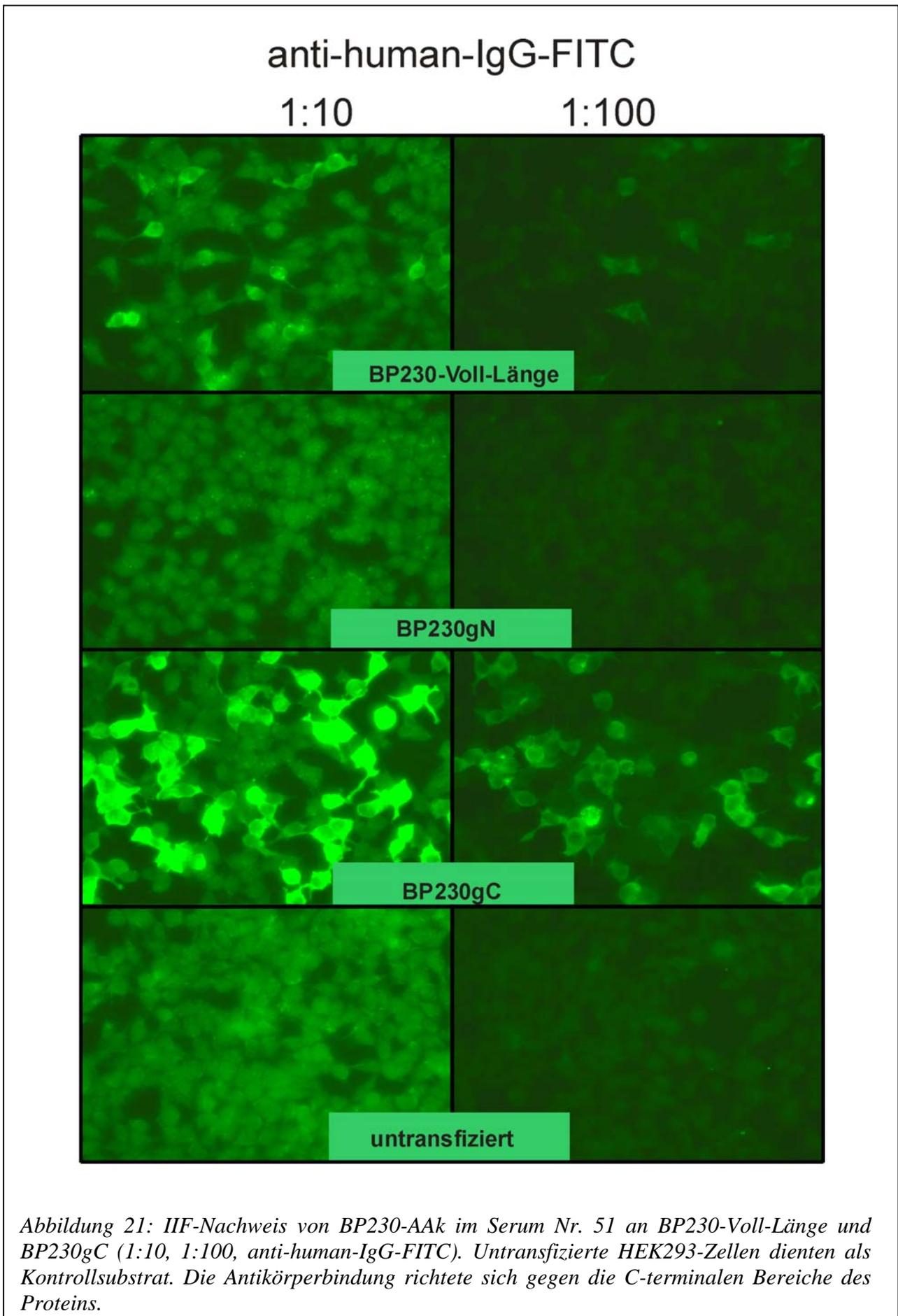
Datenbasis zu schaffen, wurden humane Spalthaut (SSS = salt split skin), humane Basalmembran und Ösophagus (*Macaca mulatta*) eingesetzt (Abbildung 20). Diese wurden mir freundlicher Weise von der EUROIMMUN AG zur Verfügung gestellt. Charakteristischer Weise reagieren die in den Seren von BP-Patienten enthaltenen Antikörper mit der Basalmembran in der Haut (Abbildung 20, Pfeile). Auf der Spalthaut ist eine Bindung im Dach der Blase (epidermaler Anteil) zu erkennen.

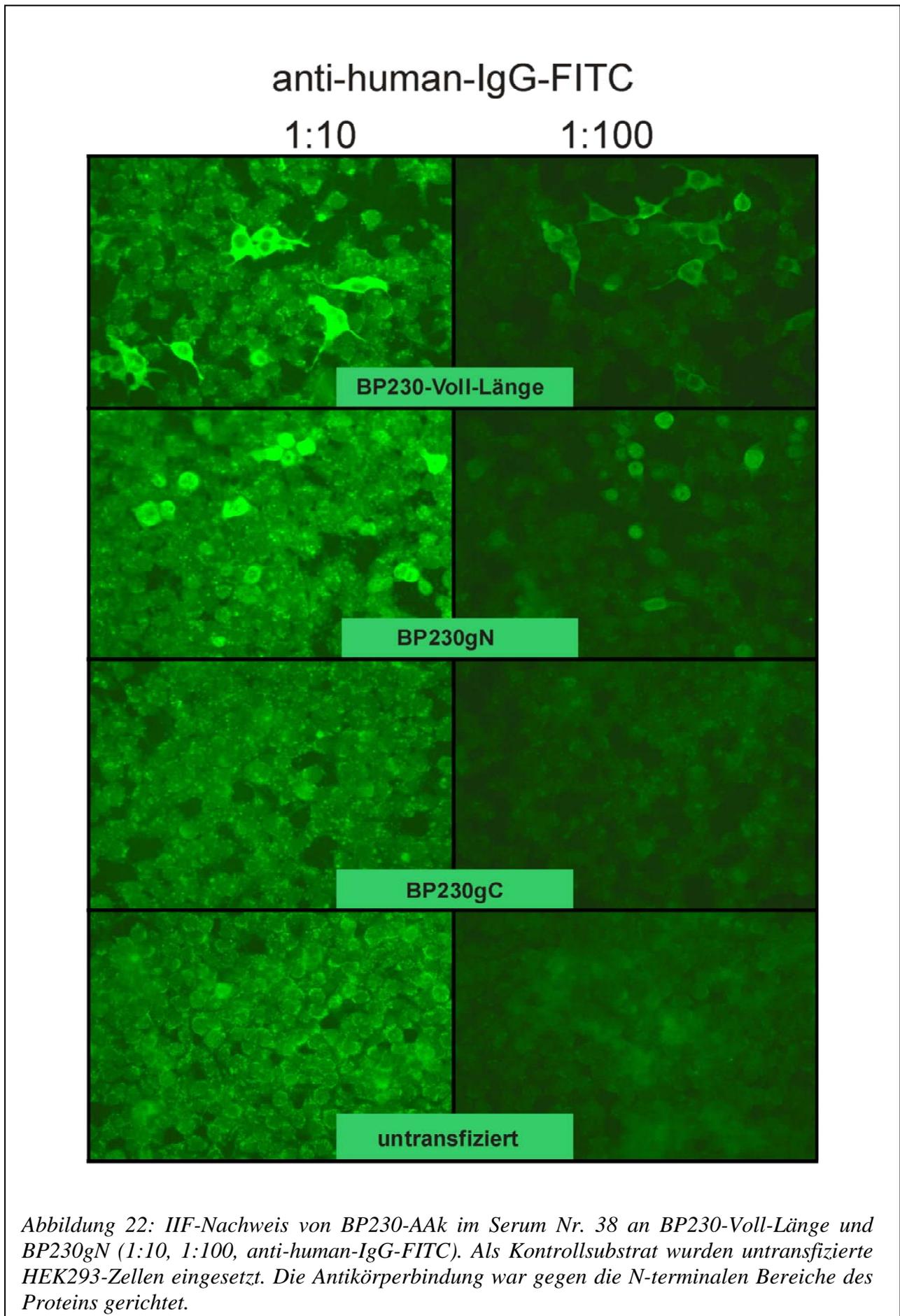


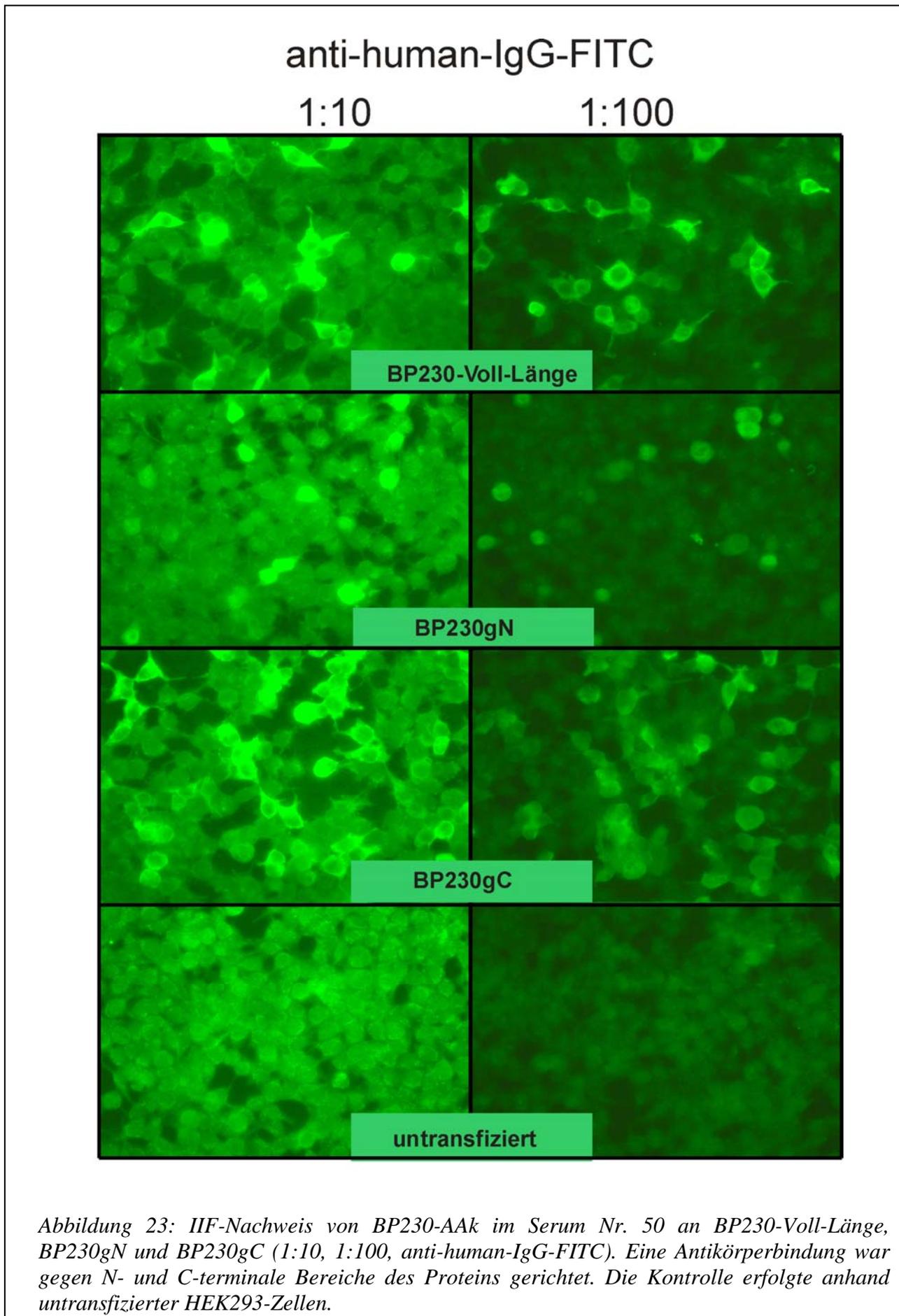
Die Bindung der anti-BP230-Antikörper an die HEK293-Zellen wurde als glatte, vorwiegend zytoplasmatisch lokalisierte Fluoreszenzfärbung sichtbar.

Anhand ihrer Autoantikörper-Bindung an die rekombinanten Polypeptide von BP230 ließen sich die Seren aus dem BP-Kollektiv in **4 Gruppen** einteilen:

1. Bindung an die C-terminale globuläre Domäne (und Voll-Länge) (Abbildung 21)
2. Bindung an die N-terminale globuläre Domäne (und Voll-Länge) (Abbildung 22)
3. Bindung an die N- und C-terminale globuläre Domäne, bzw. die Voll-Länge (Abb. 23)
4. Keine Bindung an die rekombinanten Polypeptide







27 der 49 Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid reagierten in der indirekten Immunfluoreszenz mit mindestens einem der Substrate (Tabelle 5).

*Tabelle 5: Reaktion der anti-BP230-Antikörper, gerichtet gegen rekombinante Testsubstrate im IFT. Untersucht wurden 49 Seren von Patienten mit BP und 94 Blutspender (hier nicht aufgeführt). Darstellung der Kombinationen von Polypeptiden, gegen die die Antikörper gerichtet waren.*

Gruppe	1 n = 8		2 n = 16		3 n = 3	4 n = 22	Anzahl der Seren (n)	
	Anzahl der Seren (n)	6	2	7	9	3		22
Protein BP230-	Voll-Länge	+	+	+	-	+	-	18
	gN	+	-	-	-	+	-	9
	gC	+	-	+	+	-	-	22

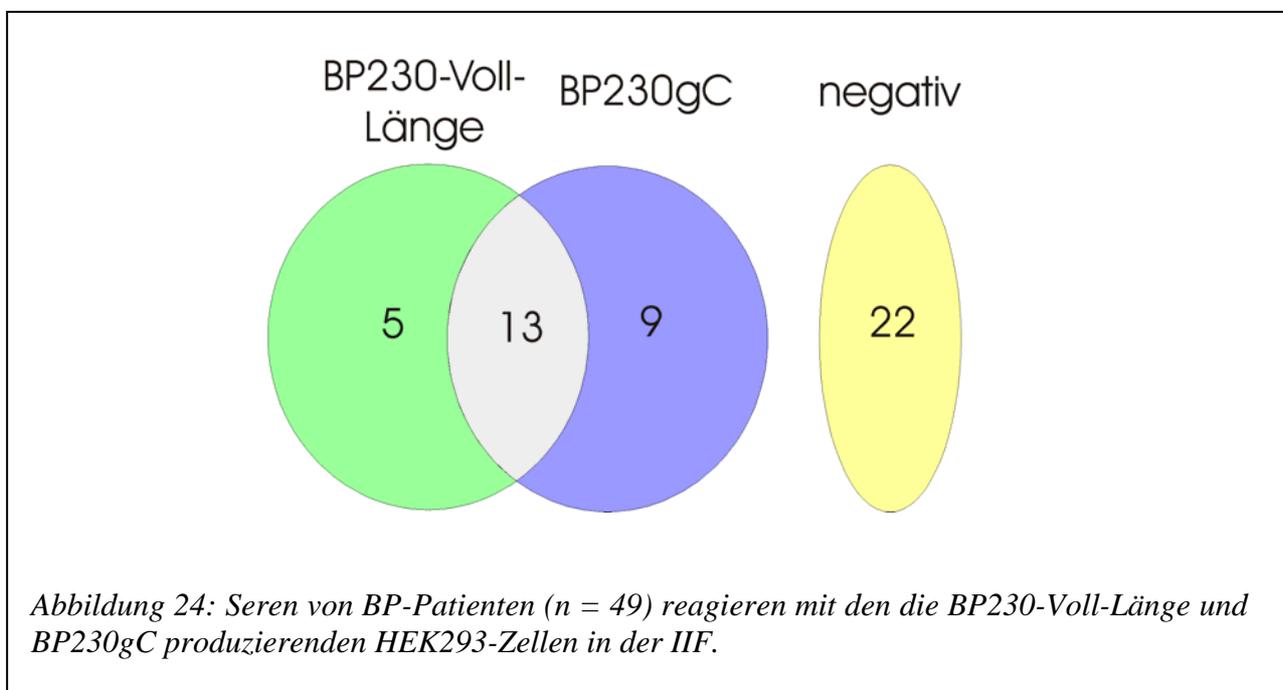
Bei Seren von 6 Patienten mit bullösem Pemphigoid stellte sich eine gegen jedes Test-Substrat gerichtete Antikörperbindung ein. In 2 Seren waren ausschließlich Antikörper gegen die BP230-Voll-Länge (orange) vorhanden. Entweder erfolgte die Antikörperbindung an konformationelle Epitope, die nur dann ausgebildet wurden, wenn das ganze Protein exprimiert wurde oder an den für die Rod-Domäne kodierenden Bereich. BP230gC reichte aus, um bei 16 Patientenseren anti-BP230-Antikörper nachzuweisen (blau), bei 3 Seren (grün) genügte BP230gN oder die BP230-Voll-Länge. 22 Seren besaßen anhand der Ergebnisse in der indirekten Immunfluoreszenz keine BP230-Antikörper. Aufgrund der fehlenden Reaktion aller Seren von gesunden Blutspendern gegen die Substrate betrug die Spezifität jedes einzelnen Substrats 100%.

Eine zusätzliche Kontrolle des Testsystems stellte die Untersuchung weiterer Seren-Kollektive (siehe 2.5) auf ihre Reaktivität mit den transfizierten Zellen als Substrat in der IIF dar: Seren von Patienten mit PV (n = 16) enthalten keine Antikörper gegen BP230, Patienten

mit PG (n = 11) nur selten (siehe 1.3). In einem Kollektiv aus Seren von Patienten mit nicht-inflammatorischen Autoimmunerkrankungen der Haut im Alter über 70 Jahren (n = 101) sollte das Vorhandensein von anti-BP230-Antikörpern analysiert werden, denn das Immunsystem soll sich im fortschreitenden Lebensalter verändern (Hasler *et al.* 2005).

Nur bei einer Patientin mit Pemphigoid gestationis konnten Antikörper gegen die BP230-Voll-Länge und BP230gN nachgewiesen werden. Kein Patient mit Pemphigus vulgaris besaß Antikörper gegen die rekombinanten Testsubstrate. Von 101 Blutspendern konnten bei 7 Antikörper gegen eines oder mehrere der rekombinanten Polypeptide identifiziert werden. Mit den untransfizierten HEK293-Zellen als Kontrollsubstrat stellte sich keine Antikörperbindung ein.

Um die Gesamtheit der anti-BP230-Antikörper in Seren aus dem BP-Kollektiv zu erfassen, waren die Varianten BP230-Voll-Länge und -gC zusammengenommen ausreichend (Abbildung 24). BP230gN lieferte keine zusätzlichen positiven Ergebnisse. Es konnten mit BP230gC Antikörper in 9 Seren nachgewiesen werden, die mit der BP230-Voll-Länge nicht gemessen wurden.



Es konnte zunächst nicht ausgeschlossen werden, dass die gebildete Antigenmenge zu niedrig für den Nachweis von Antikörpern in geringer Konzentration war. Deshalb wurde exemplarisch das Zell-Lysat von pTriEx-1-BP230gC exprimierenden HEK293-Zellen für den

Westernblot verwendet. Die Membranen wurden mit repräsentativen Seren aus dem BP-Kollektiv inkubiert. Es konnten keine anti-BP230gC-Antikörper mit diesem Substrat nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Somit konnte die Vermutung bezüglich einer kaum messbaren Expressionsrate bestätigt werden.

Weil für den C-terminalen Bereich besonders immunogene Eigenschaften beschrieben sind (z. B. Kromminga *et al.*, 2004), sollte im Folgenden ein Epitopmapping mit heterolog, bakteriell exprimierten Polypeptiden durchgeführt werden. Dadurch sollten die relevanten Bereiche weiter als bisher in der Literatur beschrieben eingegrenzt werden und die Sensitivität bei der Bestimmung der Antikörper gesteigert werden.

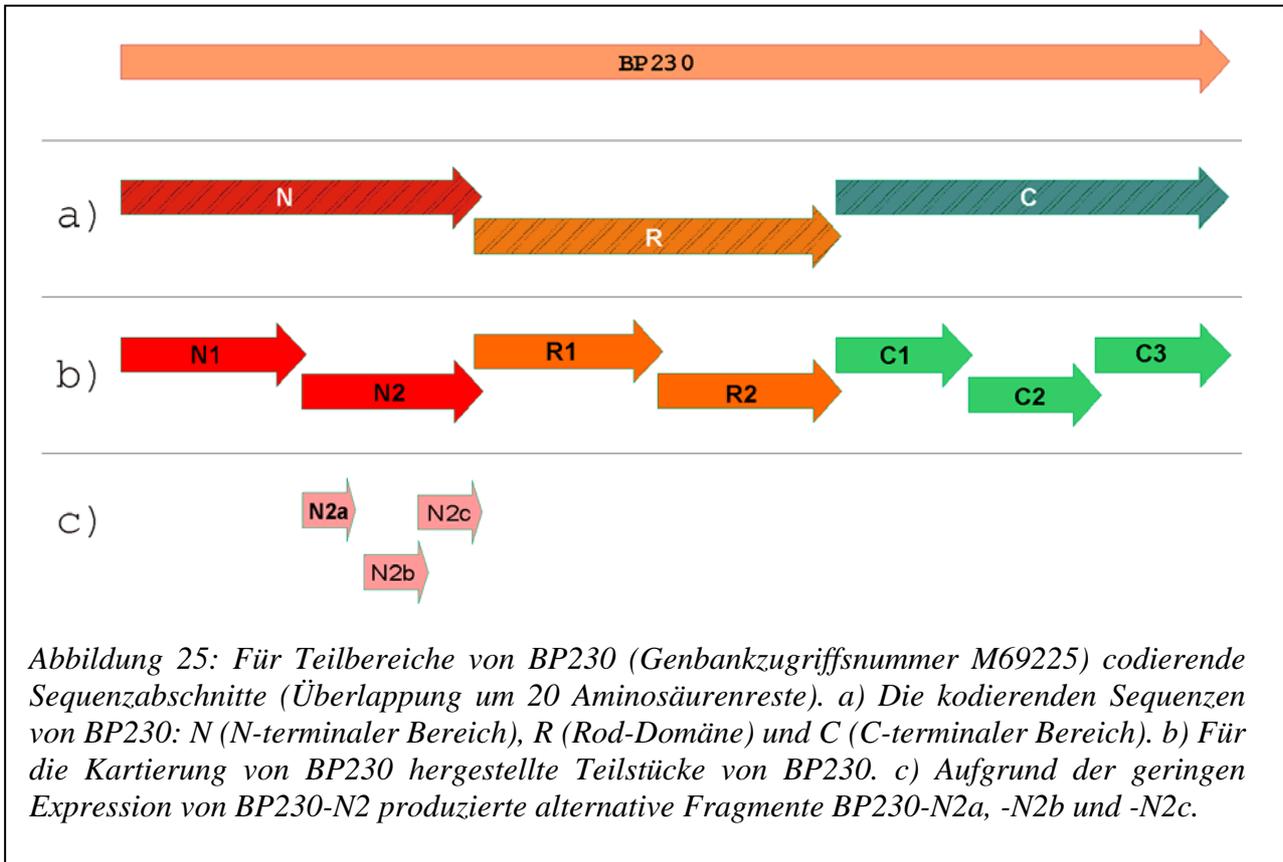
### 3.3 Herstellung der Expressionskonstrukte (bakterielles System)

Zur Identifizierung von Bereichen auf BP230, die bevorzugt von anti-BP230-Autoantikörpern gebunden werden, wurde ein Epitopmapping mit 5 N-terminalen, 3 C-terminalen und 2 Fragmente der Rod-Domäne durchgeführt. Zur Analyse linearer Epitope bot es sich an, die Proteine im bakteriellen Expressionssystem herzustellen. Für eine optimale Ausbeute der Polypeptide wurden BP230-Fragmente im Größenbereich von 20-50 kD erzeugt, da kleinere und größere Proteine tendenziell zu einer Verringerung der Ausbeute führen. Sie überlappten in Anlehnung an eine „PepScan“-Analyse um 20 Aminosäurereste, um keine B-Zell-Epitope unberücksichtigt zu lassen. Die Analyse wurde im Westernblot-System durchgeführt.

Die Ergebnisse sollten die Grundlage für die Entwicklung eines ELISA bilden, der die anti-BP230-Autoantikörper in Seren von Patienten misst.

#### 3.3.1 DNA-Klonierungsarbeiten

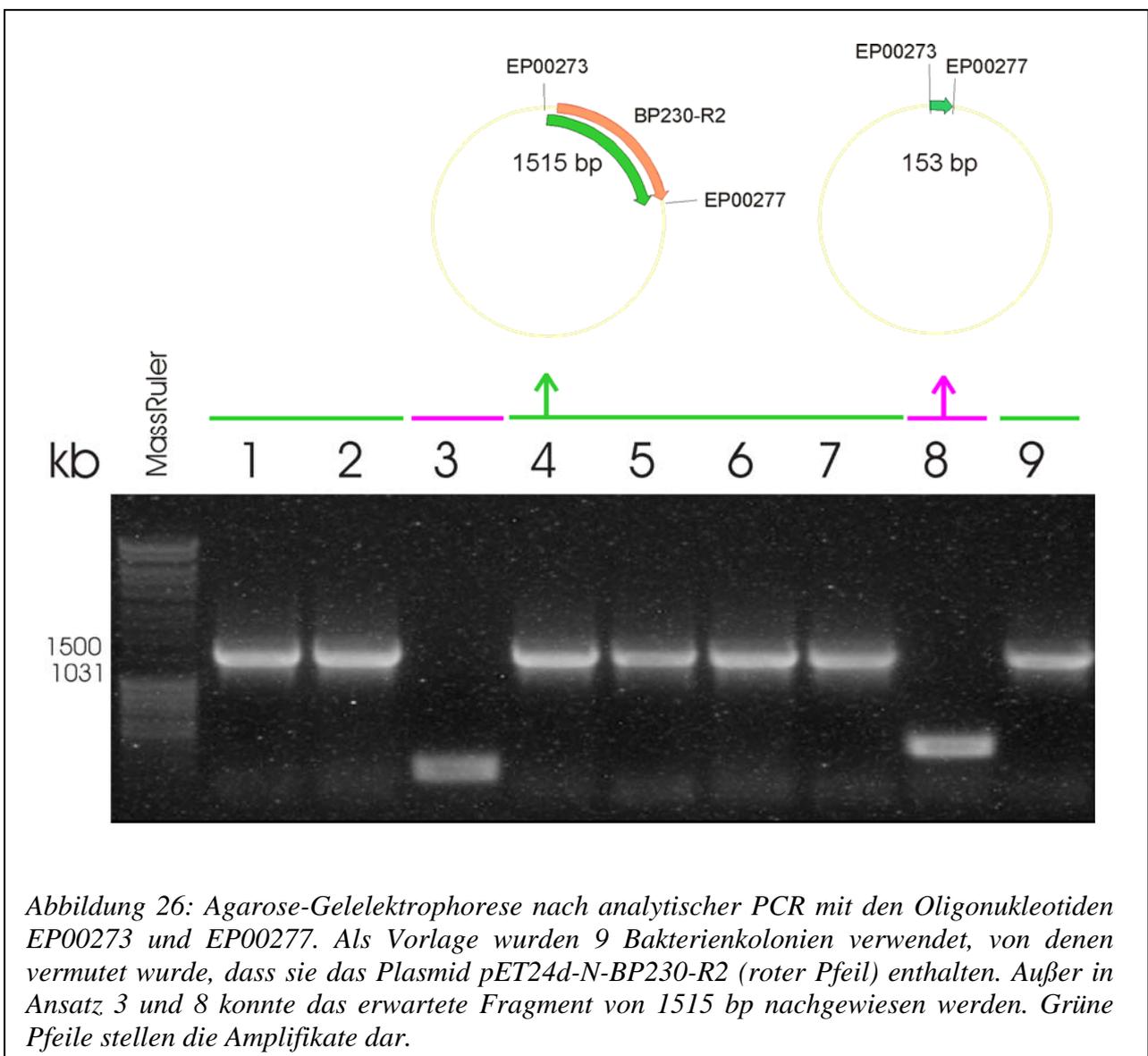
Die Nukleotidsequenz der für BP230 kodierenden DNA (Genbankzugriffsnummer M69225) wurde in drei etwa gleich große, sich um etwa 20 Aminosäuren überlappende Segmente unterteilt (BP230-N, BP230-R und BP230-C). Ausgehend von den für diese Bereiche kodierenden Sequenzen, wurde feiner untergliedert in BP230-N1 und -N2, BP230-R1 und -R2, BP230-C-1, -C2 und -C3 (Abbildung 25). Da die Ausbeute für BP230-N und -N2 sehr gering war (siehe 3.3.6), wurden drei kleinere, überlappende Teilfragmente hergestellt (BP230-N2a, -N2b und -N2c). Dadurch sollte die Problemregion weiter eingegrenzt und die Proteinexpression gesteigert werden.



Für die PCR-Amplifikation der BP230 cDNA-Segmente wurden die kommerziellen cDNA-Klone DKFZp686C04183Q und IRAKp961A12140Q (siehe 2.8) oder genomische DNA der humanen Zelllinie HEK293 (siehe 2.11) als Vorlage genutzt. Bei DKFZp686C04183Q handelt es sich um einen 5'-EST-Klon, der vom 5'-Ende sequenziert ist und dessen Sequenz vom 3'-Ende nicht analysiert wurde. Im Gegensatz dazu ist IRAKp961A12140Q ein cDNA-Klon, dessen Sequenz vollständig bekannt ist. Für die Bereiche der Rod-Domäne (BP230-R und -R'), die durch die kommerziellen cDNAs nicht abgedeckt wurden, wurde genomische DNA der humanen Zelllinie HEK293 (siehe 2.11) verwendet. Da die kodierenden Sequenzbereiche auf zwei Exons lokalisiert waren, wurden die Amplifikate durch Overlap-PCR (siehe 2.13.1.1) zusammengesetzt. In Abbildung 11 (siehe 2.12.2.1) ist das Amplifikationsschema für die Expressionskonstrukte gezeigt. Für die Herstellung der cDNA-Teilbereiche von BP230-N2 wurden die in Abbildung 12 dargestellten Oligonukleotide verwendet.

Die synthetisierten DNA-Abschnitte wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen restringiert, um in die mit *NcoI* und *XhoI* linearisierten Vektoren pET24d-N bzw. pET24d (siehe 2.9) durch die T4-DNA-Ligase integriert zu werden (siehe 2.13.5). Die Plasmide unterscheiden sich in der Positionierung der für den His-Tag™ kodierenden Sequenz. Die

Amplifikate wurden bis auf BP230-N2 in pET24d-N ligiert und in Zellen des Stammes *E. coli* RosettaBlue(DE3)pLacI (siehe 2.10) transformiert (siehe 2.13.6). Dieser kodiert zusätzlich für sieben tRNAs (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, CGG), die selten in Bakterien aber oft in eukaryotischen Zellen auftreten. Nach 12 Stunden wurden die Bakterienkolonien mittels einer analytischen PCR (siehe 2.13.1) vorselektiert (vgl. pET24d-N-BP230-R2, Abbildung 26). Es war ein Fragment von 1515 bp zu erwarten, wenn das Plasmid ein Insert enthielt, und eines von 153 bp, wenn dieses nicht in den Vektor integriert wurde. In den Bakterienklonen 1, 2, 4 bis 7 und 9 konnte ein Fragment von 1515 bp nachgewiesen werden. Klon 3 und 8 enthielten Plasmide ohne dieses Insert.

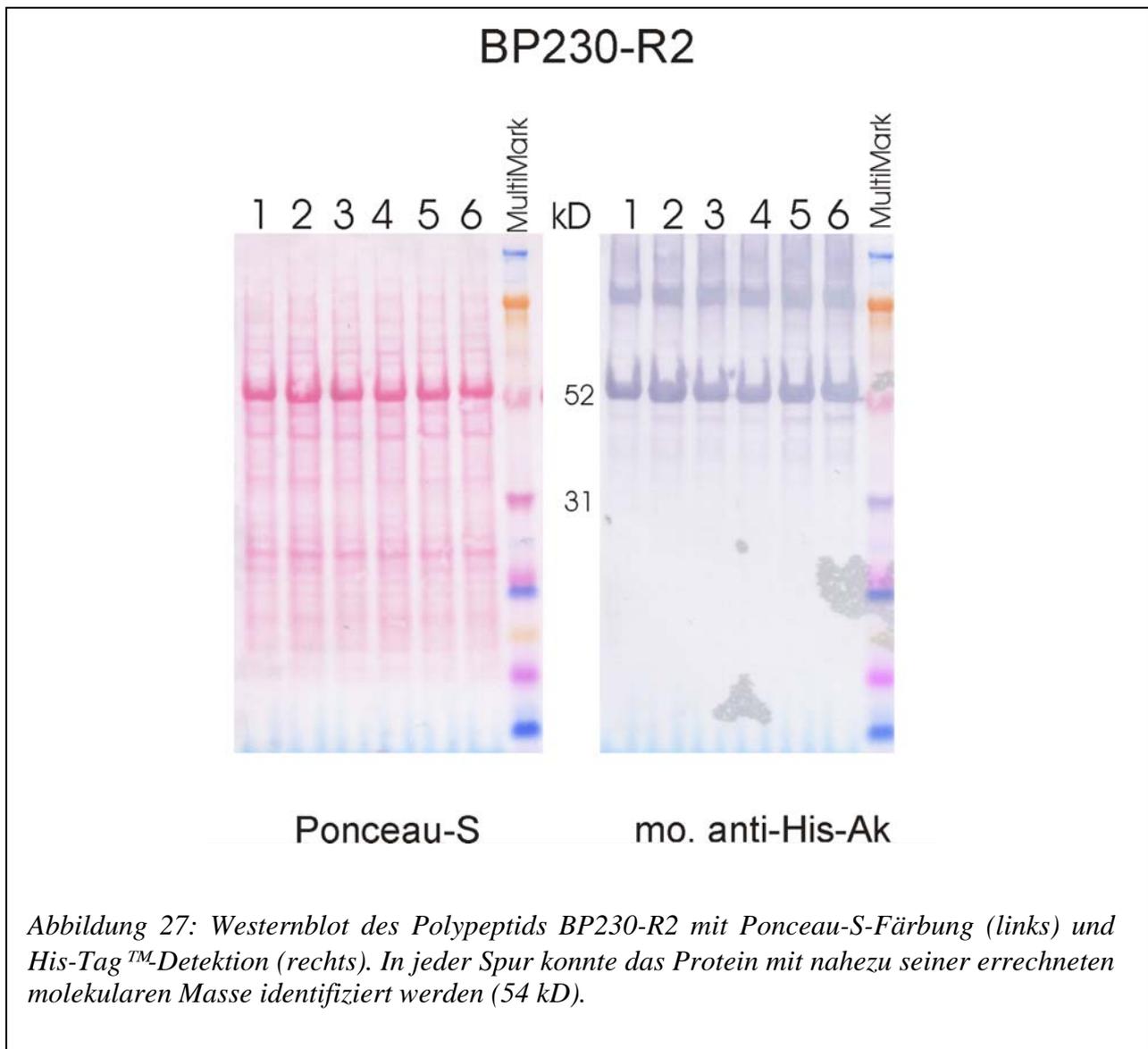


Von den Kolonien, die das gewünschte Insert enthielten, wurden Flüssigkulturen angelegt. Die Analyse der funktionellen Expression wurde in der Testexpression (siehe 2.13.8) durchgeführt.

### 3.3.2 Testexpression

Die Funktionalität der Expressionsplasmide wurde durch einen Nachweis der rekombinanten Polypeptide über eine His-Tag<sup>TM</sup>-Detektion im Westernblot überprüft. Damit ein Protein für die weitere Analytik eingesetzt werden konnte, musste es mit seiner apparenten molekularen Masse nachgewiesen werden. War das nicht gegeben, musste davon ausgegangen werden, dass das entsprechende Expressionsplasmid nicht funktionell gewesen ist. Bei der Kontrolle (untransfizierte Zellen) durfte ein Molekül dieser Größe nicht identifiziert werden. Zusätzlich wurden nach Ponceau-S-Färbung die Intensitäten der dem jeweiligen rekombinanten Protein entsprechenden Bande der unterschiedlichen Klone untereinander verglichen. Der Klon mit der stärksten Bandenintensität wurde als derjenige mit der besten Ausbeute ausgewählt.

Es konnte für die Polypeptide BP230-N, -N1, -N2a, -N2c, -R, -R1, -R2, -C2 und -C3 gezeigt werden, dass sie in einer für die Aufreinigung ausreichenden Menge produziert wurden und die erwartete molekulare Masse besaßen. Dieses ist beispielhaft für BP230-R2 (54 kD) in Abbildung 27 gezeigt. Die Bande nach His-Tag<sup>TM</sup>-Detektion entsprach in etwa 54 kD und damit der errechneten molekularen Masse. Die untransfizierten Zellen exprimierten kein 54 kD Protein (ohne Abbildung). Zusätzlich konnten Polypeptide anderer molekularer Massen nachgewiesen werden, bei denen es sich wahrscheinlich um Dimere bzw. Bruchstücke dieses Proteins handelte. Durch die Miniaturisierung des Westernblot (siehe 2.15.5) sollten diese Nebenprodukte in den Polypeptidgemischen später keine Rolle spielen.



Die Proteine BP230-N2 und -N2b wurden mit der zu erwartenden molekularen Masse nachgewiesen, aber die Ausbeute an rekombinantem Zielantigen war vergleichsweise gering, was nicht auf die vermehrte Verwendung seltener tRNAs zurück geführt werden konnte. Dass BP230-C und BP230-C1 mit dem monoklonalen anti-His-Antikörper nicht nachgewiesen werden konnten, deutete darauf hin, dass die Proteine nicht funktionell exprimiert wurden.

### 3.3.3 Restriktionsanalyse

Als Vorstufe zur DNA-Sequenzierung stellte ein Restriktionsverdau mit geeigneten Enzymen eine zusätzliche Kontrolle dar, um die zielgerichtete Integration des Fragments in den Vektor zu überprüfen. Außer von pET24d-N-BP230-C und -C1 konnten Restriktionsfragmente der erwarteten molekularen Masse nachgewiesen werden.

### 3.3.4 DNA-Sequenzierung

Die kodierenden Bereiche auf den Plasmiden stimmten zu 100% mit der Referenzsequenz von BP230 überein (siehe 1.2). Nur bei pET24d-N-BP230-N1 und pET24d-N-BP230-R2 wurde eine Mutation an den Positionen 144 nt und 4074 nt identifiziert, die aber zu keinem Aminosäureaustausch führten. Die Plasmide pET24d-N-BP230-C und -C1 kodierten zwischen Position 6048 nt und 6049 nt für das Intron Nr. 23 (Genbankzugriffsnummer CCDS 4959.1), wodurch das Leserasters verschoben wurde. Die kodierenden Sequenzen von pET24d-N-BP230-C1[+23] und pET24-d-N-BP230-C[+23] (Bezeichnungsänderung) mussten korrigiert werden.

### 3.3.5 Korrektur von pET24d-N-BP230-C[+23] und -BP230-C1[+23]

Bei der Sequenzierung der kodierenden Sequenzbereiche von pET24-d-N-BP230-C1[+23] und pET24-d-N-BP230-C[+23] stellte sich heraus, dass die kommerzielle cDNA DKFZp686C04183Q ein Intron (Nr. 23) enthielt. Für die Richtigstellung der Sequenz wurde davon abgesehen von genomischer DNA eine RT-PCR durchzuführen, denn von BP230 existieren mehrere Isoformen.

Für das Plasmid **pET24d-N-BP230-C[+23]** wurde folgende Strategie für die Korrektur verfolgt: pET24d-N-BP230-C[+23] wurde über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *EcoRI* (Abbildung 13) geöffnet (siehe 2.13.3), wodurch sich eine Deletion des Introns ergab. Die fehlenden Sequenzbereiche stromaufwärts und stromabwärts des Introns wurden neu synthetisiert (siehe 2.13.1), miteinander verbunden (Overlap-PCR, siehe 2.13.1.1) und in das linearisierte Plasmid integriert (siehe 2.13.5).

Das Plasmid **pET24d-N-BP230-C1[+23]** wurde durch Gensynthese korrigiert, weil nur 63 Nukleotide des Exons 24 zur Vervollständigung des Fragments fehlten. Dazu wurden drei Oligonukleotide für das 3'-Ende synthetisiert, die sich überlappten (Abbildung 14). Das Oligonukleotid EP01224 war an seinem 5'-Ende homolog zu Exon 24 und an seinem 3'-Ende zu Exon 23. Damit in der Mehrheit das vollständige Fragment synthetisiert werden konnte, wurden die äußeren Oligonukleotide in einer 10-fach höheren Konzentration als die inneren

eingesetzt. Die Integration in das linearisierte Plasmid erfolgte über *Esp3I* und *XhoI* (siehe 2.13.5).

Beide Plasmide wurden in Zellen des Stammes *E. coli* RosettaBlue(DE3)pLacI (siehe 2.10) transformiert. Bei der funktionellen Überprüfung der Konstrukte im Westernblot (siehe 2.15.5) konnte BP230-C1 der erwarteten molekularen Masse von 40 kD identifiziert werden (Abbildung 28).

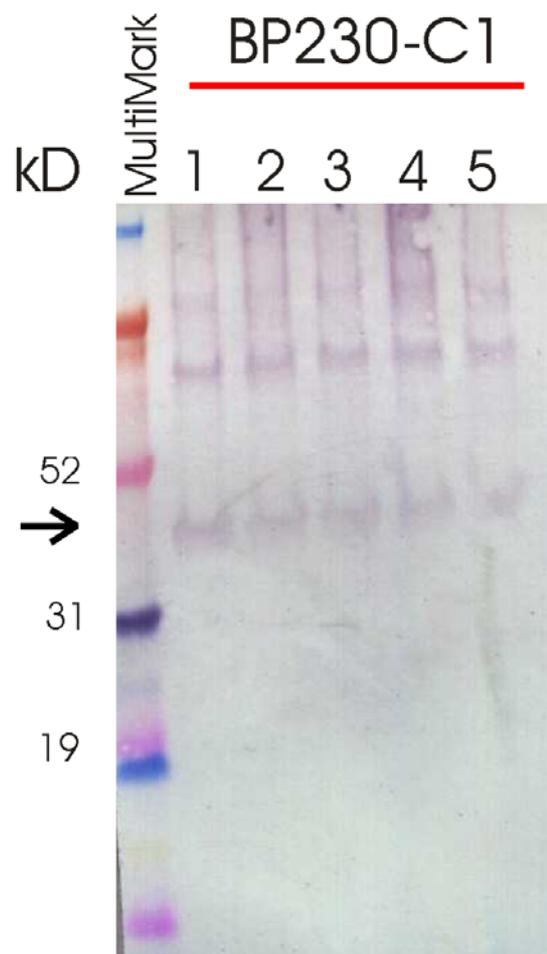


Abbildung 28: Immunbiochemische Färbung von BP230-C1. Die Inkubation erfolgte mit einem monoklonalen anti-His-Antikörper. In Spur 1 bis 5 konnte ein deutliches Signal auf der Höhe von 40 kD identifiziert werden.

Die Aminosäuresequenz des Fragments stimmte mit dem Datenbankeintrag (M69225) überein. Die bakterielle Expression von pET24d-N-BP230-C[+23] führte zu keinem funktionellen Polypeptid. In der Sequenzierung (siehe 2.13.9) konnte eine Leserastermutation an Position 6037 nt sowie ein Aminosäureaustausch von Prolin zu Leucin an Position 6426 nt

nachgewiesen werden. Weitere Korrekturmaßnahmen wurden nicht vorgenommen, denn die Polypeptide BP230-N, -R und -C sollten im Rahmen des Epitopmappings von BP230 nicht eingesetzt werden.

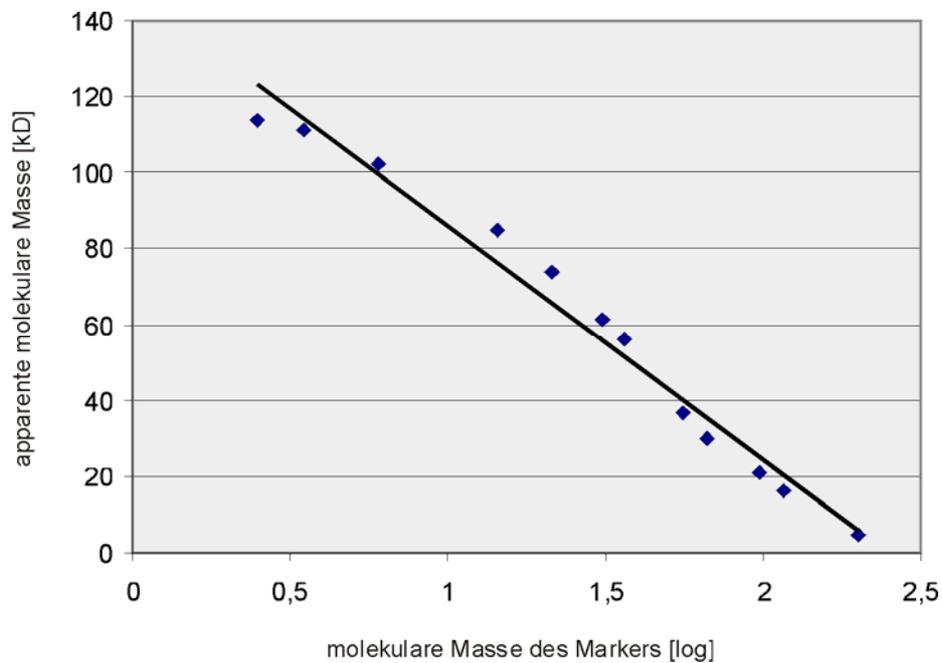
### 3.3.6 Biochemische Aufreinigung der Proteine

Für die Kartierung der durch BP-spezifische Autoantikörper erkannten Epitope auf BP230 wurden die Polypeptide im Batchverfahren (siehe 2.14.1) aufgereinigt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mechanisch im Hochdruck-Homogenisator (siehe 2.14.1.1). Unter denaturierenden Bedingungen wurden die Polypeptide aus den Einschlusskörperchen extrahiert (siehe 2.14.1.2). Die Aufreinigung erfolgte über IMAC (siehe 2.16.1.3) und Kationenaustausch-Chromatographie (siehe 2.14.1.4), wodurch negativ geladene Moleküle wie LPS herausgefiltert wurden und so unspezifische Reaktionen gegen die Wirtszelle vermieden wurden. Die Peptidkonzentrationen wurden durch den BCA-Test (siehe 2.14.1.5) bestimmt (Tabelle 6).

<i>Tabelle 6: Konzentrationen der rekombinanten Polypeptide.</i>		
Bezeichnung des Proteins	Endkonzentration (mg/ml)	Endausbeute aus 8 Liter Kulturvolumen (mg)
BP230-N1	0,52	0,884
BP230-N2	0,19	0,095
BP230-N2a	0,49	9,8
BP230-N2b	0,16	2,4
BP230-N2c	1,42	78,1
BP230-R1	0,4	4
BP230-R2	0,38	3,04
BP230-C1	1,25	7,5
BP230-C2	0,63	15,12
BP230-C3	0,74	14,8

Anhand der errechneten molekularen Massen der Polypeptide wurden die über eine lineare Regressionsgrade apparenten Massen ermittelt (Tabelle 7).

*Tabelle 7: Zusammenfassung der Proteingrößen. Lineare Regression des apparenten Molekulargewichts verglichen mit dem Marker (Bezug auf Abbildung 29).*



Bezeichnung des rek. Proteins	errechnetes Molekulargewicht (kD)	apparentes Molekulargewicht (kD)	andere Banden (kD)
BP230-N1	51	52	-
BP230-N2	52	52	17
BP230-N2a	20	14	-
BP230-N2b	20	15	-
BP230-N2c	20	15	-
BP230-R1	56	59	-
BP230-R2	54	61	-
BP230-C1	40	42	34
BP230-C2	37,6	36	-
BP230-C3	38,3	34	69

Die Reinheit der Polypeptide wurde mittels einer SDS-PAGE (siehe 2.15.3) mit Coomassie-Färbung (siehe 2.15.4) kontrolliert (Abbildung 29). Für den Fall, dass alle in der Probe enthaltenen Zielproteine und kontaminierenden Proteine sich auf eine Bande bezogen, welche der apparenten molekularen Masse des Zielproteins entsprach, wurde ein Protein als zu 95% rein definiert.

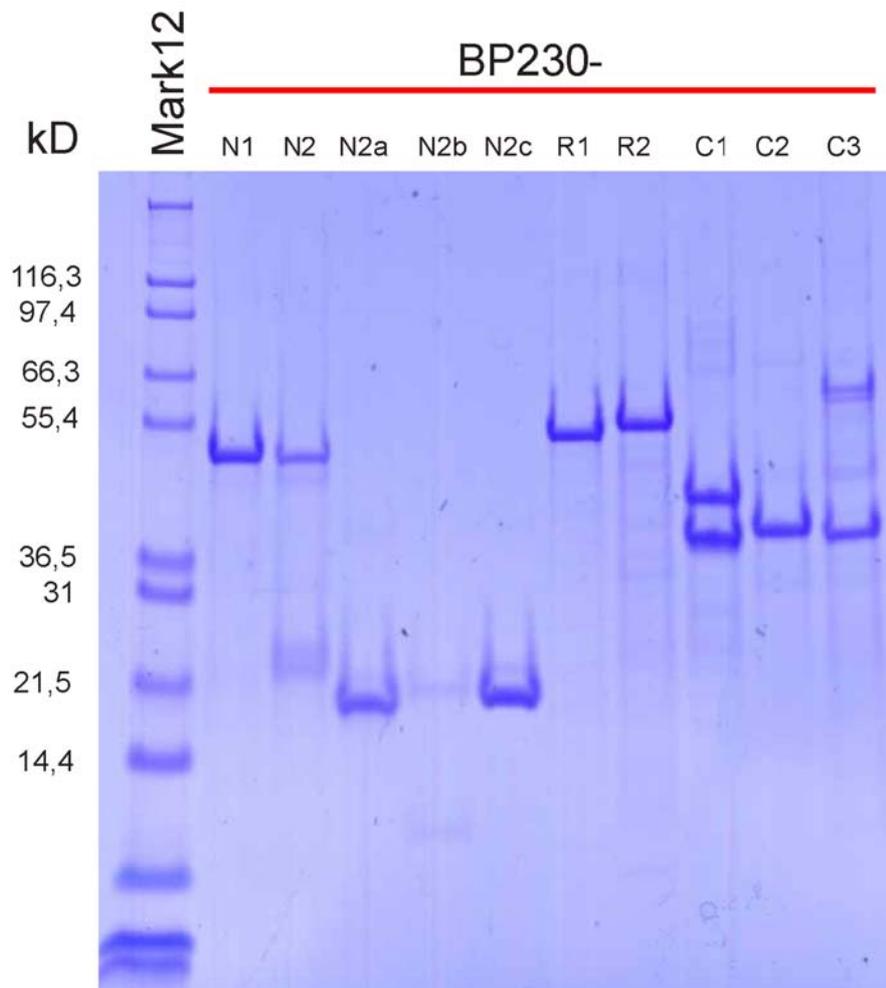
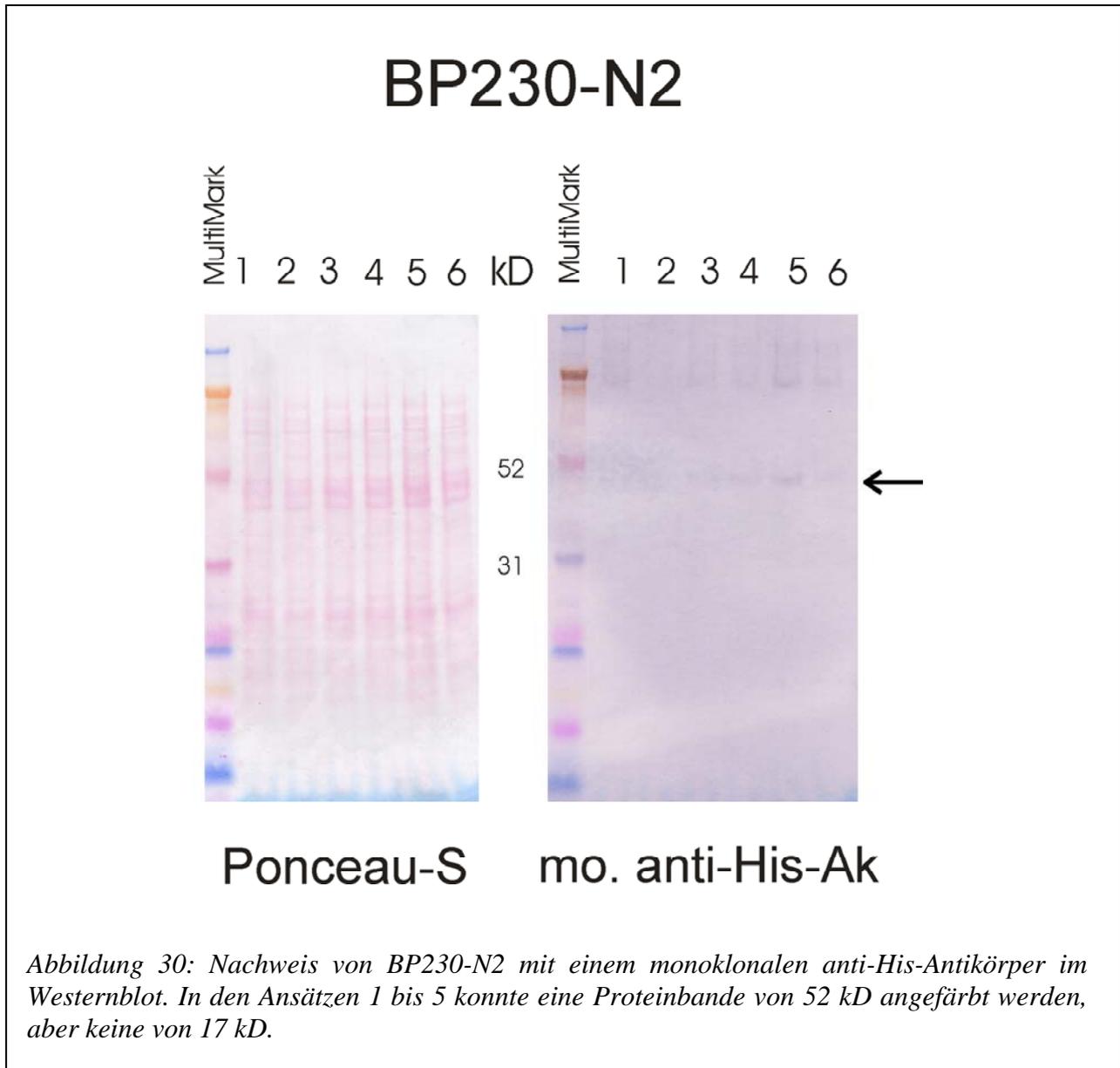


Abbildung 29: Nachweis der in der SDS-PAGE aufgetrennten Polypeptide durch Coomassie-Färbung. In jeder Spur konnte ein Protein mit der errechneten molekularen Masse identifiziert werden (1 µg/4,5 mm Proteinlösung aufgetragen.)

Die Polypeptide BP230-N1, -N2a, -N2b, -N2c, -R1, -R2 und -C2 waren zu 95% rein. Die Expression von BP230-N2 und -N2b war vergleichsweise gering gemessen an der Bandenstärke. BP230-C1 und -C3 enthielten in ihrer Lösung weitere Proteine (34 und 69 kD), die His-Tag™ reaktiv waren. Das 17 kD Protein im BP230-N2-Präparat ließ sich nicht mit

dem monoklonalen anti-His-Antikörper nachweisen (Abbildung 30). Demnach handelte es sich hierbei nicht um das Zielprotein oder Teile von diesem.



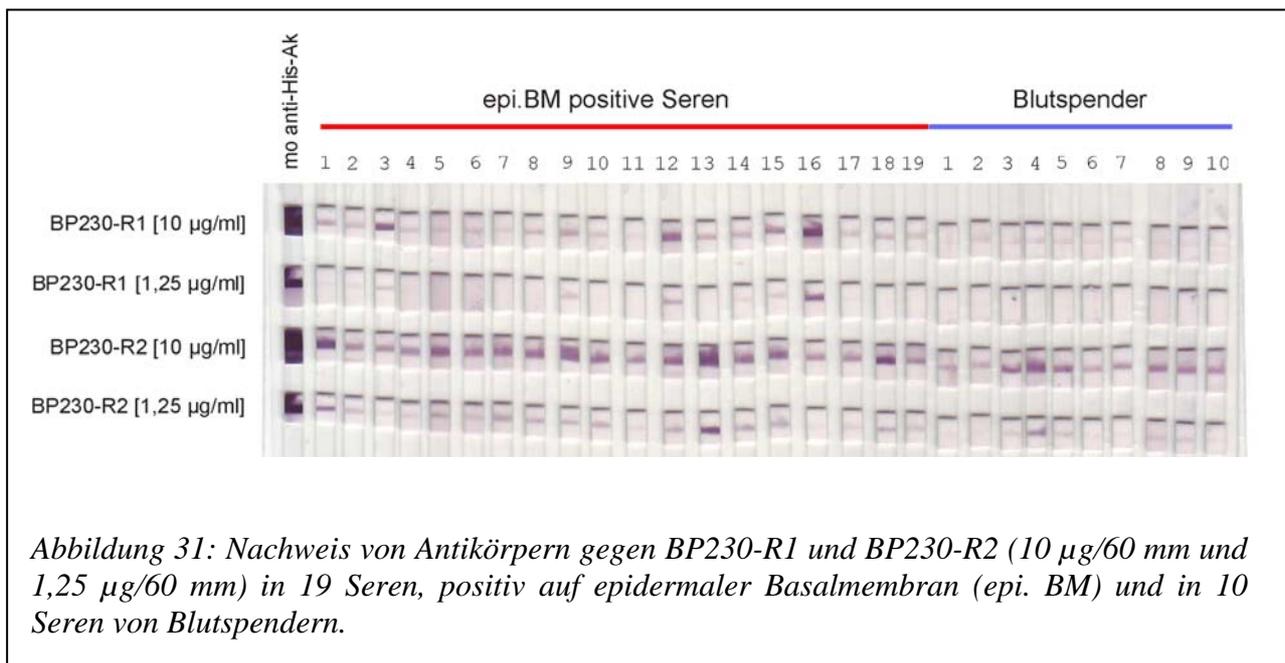
Alle Polypeptide wurden massenspektrometrisch analysiert (siehe 2.15.1.7). In den Proben, die die apparenten Massen aus Tabelle 7 besaßen, wurden die erwarteten Fragmente von BP230 identifiziert. Das BP230-N2-Präparat enthielt ein 17 kD Polypeptid, das als Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT, Genbankzugriffsnummer Q194N7) aus *E. coli* identifiziert wurde. Dieses Protein wird durch das Rosetta-Plasmid in dem verwendeten Expressionsstamm *E. coli* RosettaBlue(DE3)pLacI kodiert und dient als Selektionsmarker. Das 34 kD Polypeptid im BP230-C1-Präparat wurde als BP230-C1 identifiziert und war

vermutlich durch einen Translationsabbruch entstanden. Diese Bewertung wurde gestützt durch einen Nachweis mit dem monoklonalen anti-His-Antikörper der mit dem N-terminalen His-Tag™ reagierte.

Im Präparat BP230-C3 war ein 69 kD His-Tag™ reaktives Protein enthalten, das als BP230-C3 identifiziert wurde. Vermutlich handelte es sich um ein BP230-C3-Dimer, das auf eine kovalente Bindung des His-Tags™ an Metallionen (Nickel) zurückzuführen war, die in der Proteinaufreinigung eingesetzt wurden. Weil die Domänen von BP230 aufgrund der bakteriellen Expression nicht funktionell erhalten wurden, konnte das Epitopmapping im Westernblot durchgeführt werden, wodurch Dimere bzw. Fragmente der rekombinanten Polypeptide durch die vorherige elektrophoretische Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel auf der Blot-Membran räumlich ausreichend voneinander getrennt wurden, und eine weitere Aufreinigung nicht erforderlich war.

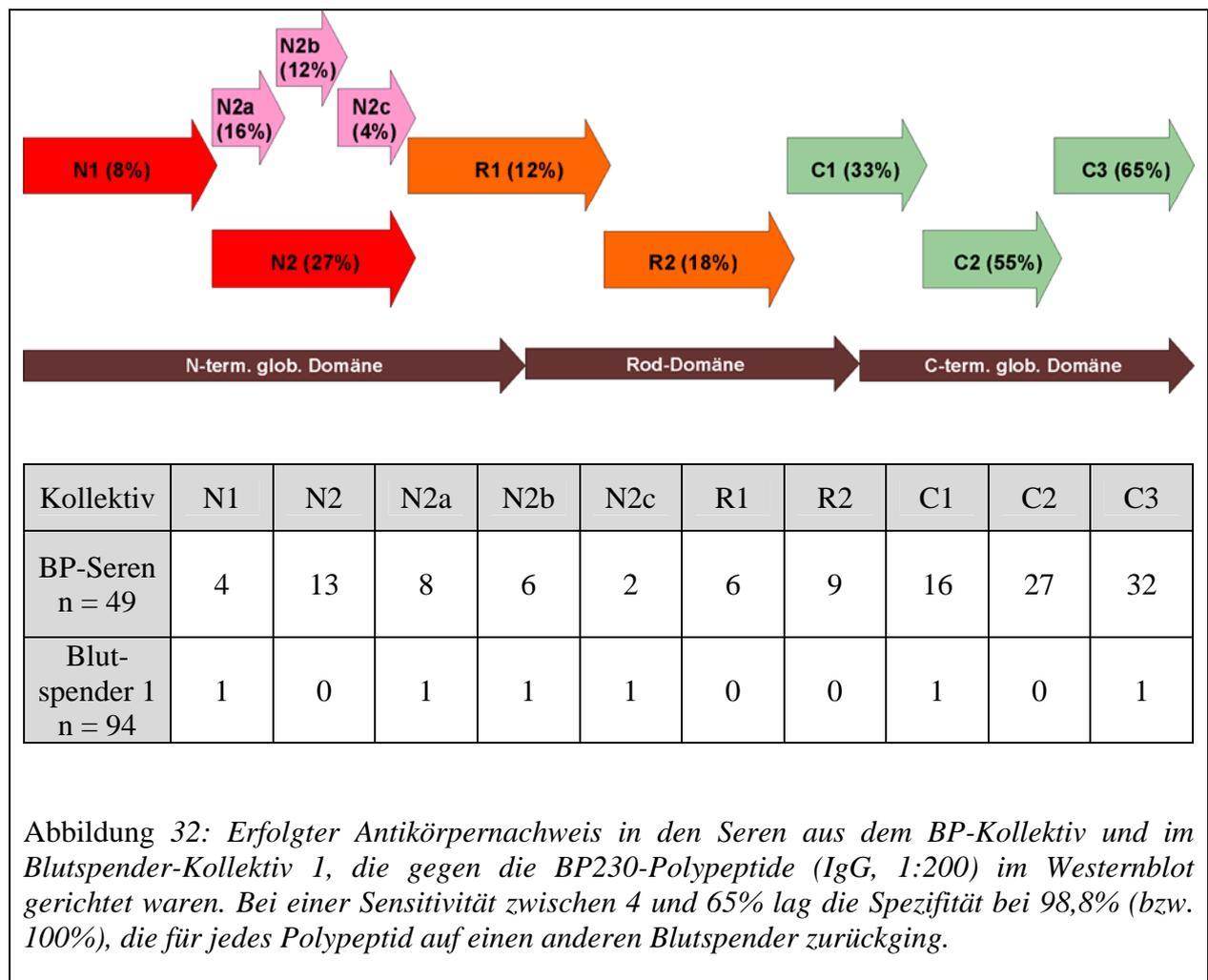
### 3.4 Analyse zur Rolle von linearen Epitopen des BP230 beim BP

Die Herstellung der Inkubationsstreifen erfolgte im Anschluss an einen Westernblot (siehe 2.15.5). Es wurde eine Normierung der Polypeptid-Konzentration über die Blutspenderreaktion vorgenommen. Pro SDS-Polyacrylamidgel wurden 10 µg Polypeptid pro 60 mm Vertiefung im Gel eingesetzt. In dieser Konzentration wiesen die Polypeptide BP230-R2 und -C1 eine geringe Spezifität in Bezug auf die Blutspenderreaktion auf. Um diese bei gleichbleibender Sensitivität zu erhöhen, wurde die Polypeptid-Konzentration im Gesamtansatz gesenkt. In einer Konzentration von 1,25 µg/60 mm BP230-R2 und 2 µg/60 mm -C1 lagen eine optimale Sensitivität und Spezifität vor. In Abbildung 31 sind die Polypeptide BP230-R1 und -R2 dargestellt, ideal in einer Konzentration von 10 µg/60 mm und 1,25 µg/60 mm. Unter Verwendung von 10 µg/60 mm BP230-R2 wies das Polypeptid eine geringe Spezifität auf.



Die Seren des BP-Kollektivs und des Blutspender-Kollektivs 1 (siehe 2.5) wurden hinsichtlich ihrer Autoantikörperreaktion gegen BP230 untersucht. Durch die Miniaturisierung des Testsystems (siehe 2.15.5.1) konnten diesbezüglich mit geringem Inkubationsaufwand umfangreiche Antikörperprofile erfasst werden. Die Auswertung der densitometrisch quantifizierten Bandenintensitäten erfolgte mittels der

Bildverarbeitungssoftware „ImageJ“ (National Institutes of Health, USA). Das Programm errechnet für eine definierte Fläche eine Graustufe zwischen 0 und 256. Als Cut-off wurde der Wert definiert, der über dem Wert der zweithöchsten Blutspender-Reaktion lag, zuzüglich einer Standardabweichung. Dadurch ergab sich rechnerisch mindestens eine Spezifität von 98,9% (1 Blutspender positiv) oder 100% (kein Blutspender positiv). Die Ergebnisse wurden nicht statistisch ausgewertet, da sie nur Tendenzen aufzeigen sollten. Sie sind in Abbildung 32 zusammengefasst.



Vier Seren des BP-Kollektivs enthielten Antikörper gegen BP230-N1 (8%), 13 (27%) gegen BP230-N2. Acht Seren besaßen Antikörper gegen -N2a (16%), 6 gegen -N2b (12%) und 2 gegen -N2c (4%). Bei 6 (12%) bzw. 9 (18%) Seren wurden Antikörper nachgewiesen, wenn BP230-R1 oder -R2 als Substrat eingesetzt wurden.

Die Mehrzahl der durch BP230-spezifische Antikörper erkannten Epitope war im Bereich der C-terminalen globulären Domäne lokalisiert (Beispiel in Abbildung 33). Mit BP230-C1 wurden in 16 (33%), mit -C2 in 27 (55%) und mit -C3 in 32 (65%) Seren Antikörper gebunden. Gegen BP230-C2 waren keine zusätzlichen Reaktionen zu BP230-C3 zu verzeichnen. Mit BP230-C1 konnten in zwei Seren Antikörper nachgewiesen werden, die nicht mit BP230-C3 gefunden wurden. Die Reaktion mit den Seren aus dem Kollektiv der Blutspender war vergleichsweise gering.

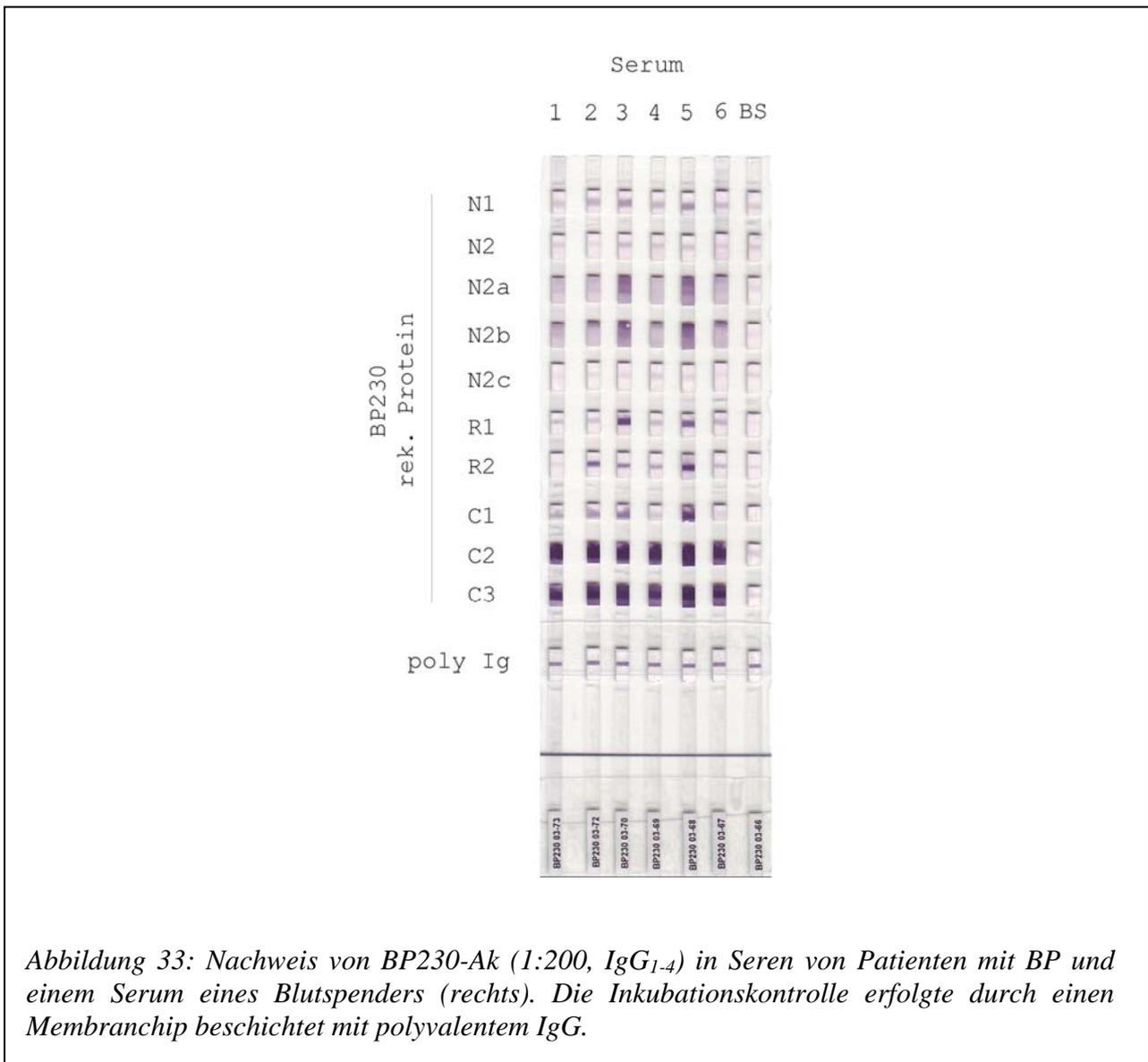
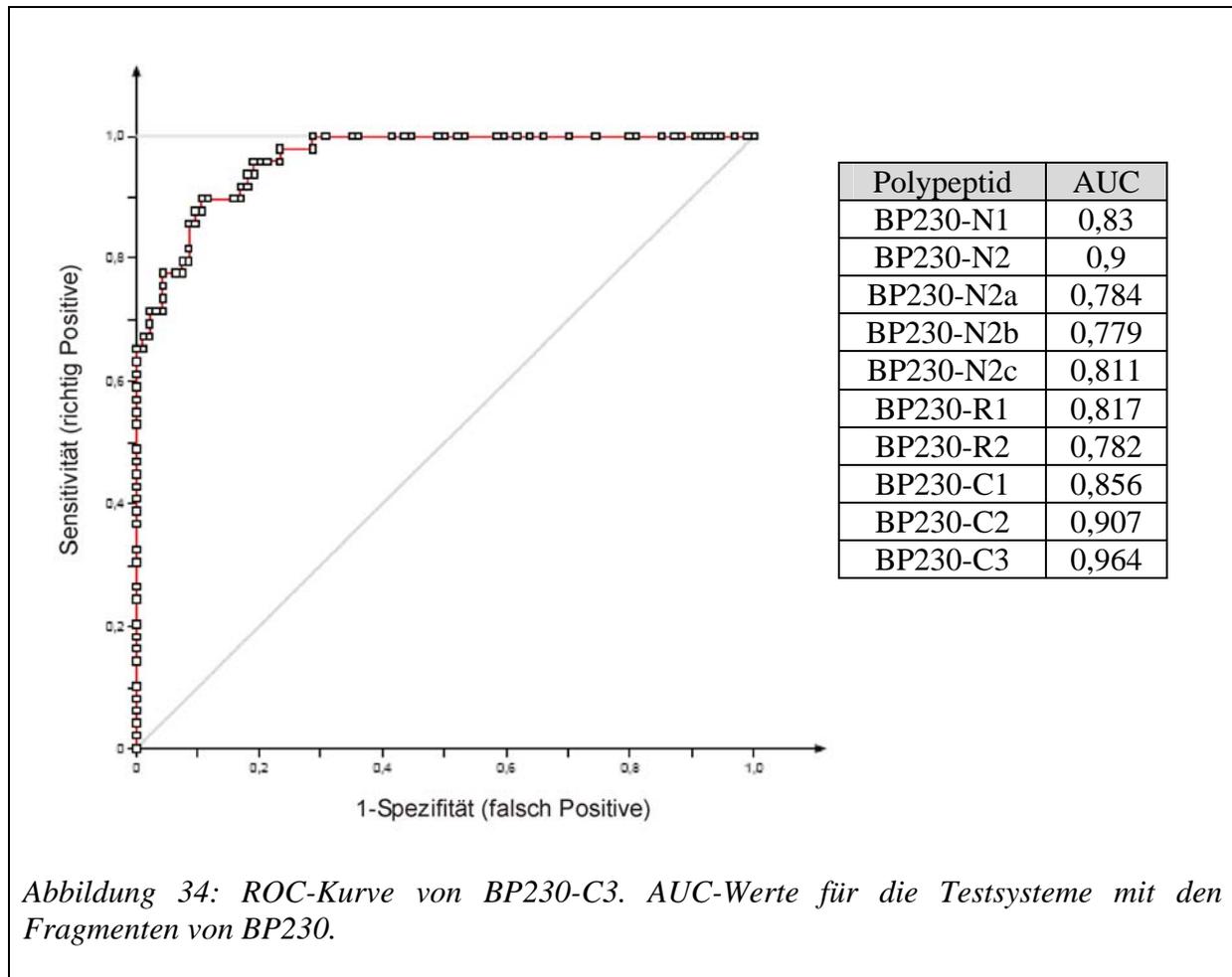


Abbildung 33: Nachweis von BP230-Ak (1:200, IgG<sub>1-4</sub>) in Seren von Patienten mit BP und einem Serum eines Blutspenders (rechts). Die Inkubationskontrolle erfolgte durch einen Membranchip beschichtet mit polyvalentem IgG.

Um das Testsystem zu bewerten, wurde eine „Receiver Operating Characteristic“ (ROC)-Kurve (Abbildung 34) mit Hilfe einer Software der EUROIMMUN AG erstellt. Je besser es geeignet ist, zwischen dem richtig positiven Kollektiv und dem richtig negativen Kollektiv zu

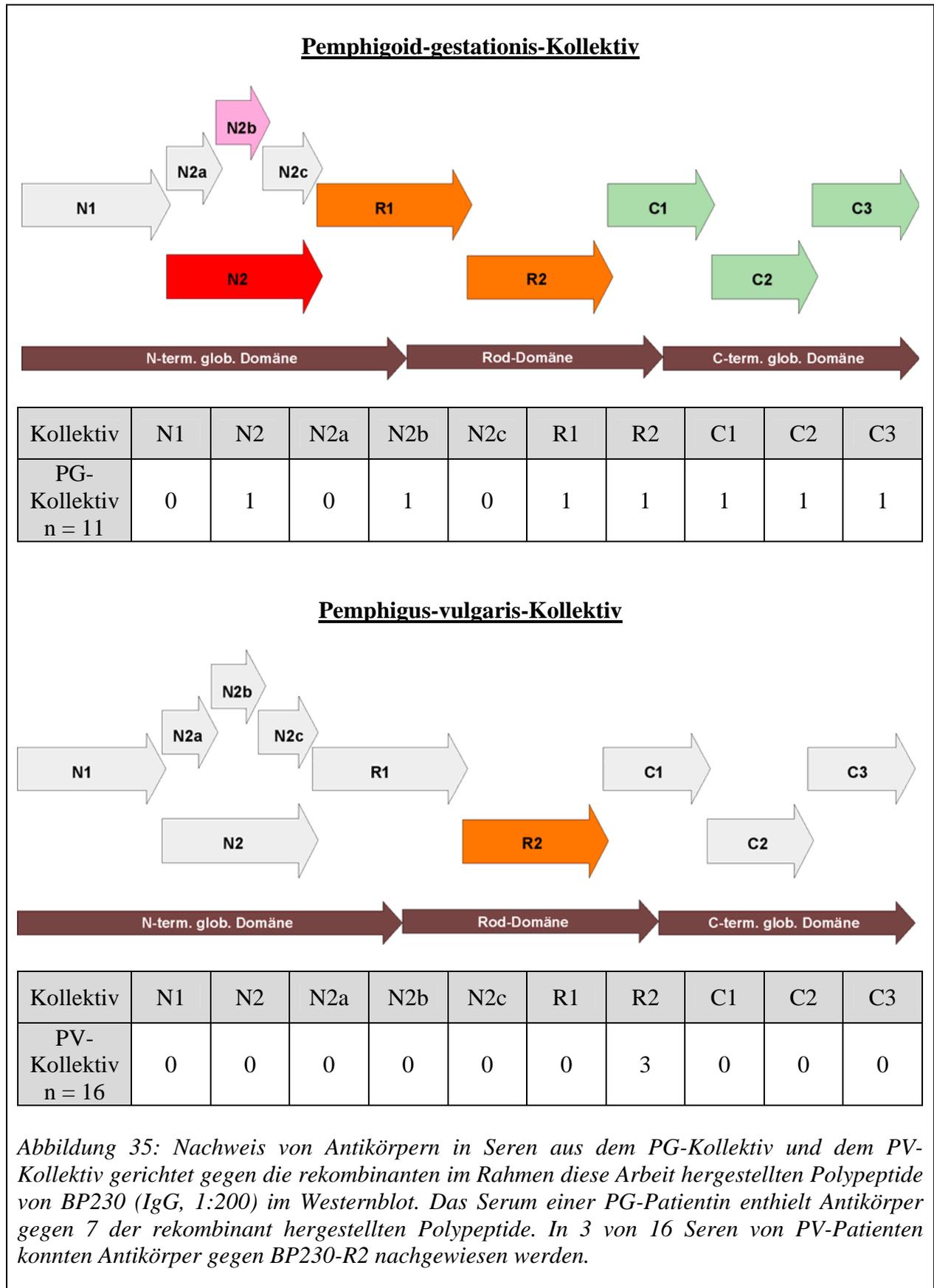
diskriminieren, desto mehr strebt der Wert für die Fläche unter der Kurve (AUC-Wert) gegen 1. Den höchsten AUC-Wert (0,964) erreichte der Test mit BP230-C3.



Zur Ermittlung der Spezifität wurden die Seren aus zwei Kollektiven (siehe 2.5) auf ihre Reaktivität mit den Antigenen im Westernblot untersucht:

- Pemphigoid-gestationis-Seren (n = 11)
- Pemphigus-vulgaris-Seren (n = 16)

Es fand keine neuerliche Untersuchung der Spezifität über die Blutspender-Reaktion statt. Es konnten nur in einem Serum einer PG-Patientin Antikörper gegen BP230-N2, -N2b, -R1, -R2, -C-1, -C2 und -C3 nachgewiesen werden. In diesem Serum konnten bereits in der IIF Antikörper gefunden werden. Mit BP230-R2 wurden Antikörper in 3 Seren von Patienten mit Pemphigus vulgaris identifiziert (Abbildung 35).



## 3.5 ELISA mit BP230-C3

### 3.5.1 Entwicklung eines ELISA für das Polypeptid BP230-C3

Die Verwendung des Polypeptids BP230-C3 im Westernblot führte zu einer Sensitivität von 65% gemessen am Kollektiv von BP-Patienten bei einer Spezifität von 98,9% gemessen am Kollektiv gesunder, junger Blutspender. Die anderen Peptidvarianten wiesen geringere Sensitivitäten bei gleicher Spezifität auf. Deshalb wurde für den ELISA zum Nachweis von Antikörpern bei Patienten mit bullösem Pemphigoid das Polypeptid BP230-C3 ausgewählt.

Der ELISA wurde hinsichtlich Beschichtungs- und Blockierungspuffer, Antigenkonzentrationen und Beschichtungs-Oberflächen optimiert. In einer Konzentration von 4 µg/ml wurde das Polypeptid in einem PBS-haltigen Puffer auf einer MaxiSorp™-Oberfläche beschichtet. Die Blockierung erfolgte mit einem Tween-20-haltigen Puffer (EUROIMMUN AG) über 12 Stunden bei 4°C. In Hinblick auf eine Kommerzialisierung des Produkts soll auf die Herstellungsparameter nicht näher eingegangen werden.

Die Seren der 49 BP-Patienten und die des Blutspender-Kollektivs 1 (n = 94) (siehe 2.5) wurden mit dem Anti-BP230-C3-ELISA getestet. Die Inkubation des ELISA erfolgte wie in 2.15.2 angegeben. Der Cut-off wurde auf den Mittelwert plus zwei Standardabweichungen der gemessenen Extinktionen ( $450_{\text{nm}}$ ) der Seren von Blutspendern festgelegt. Die Trennung zwischen den richtig positiven und den richtig negativen Seren war bei diesem Wert am ehesten gegeben. Die Spezifität betrug 97%. Bei 31 von 49 Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid und 3 Seren von Blutspendern konnten anti-BP230-Autoantikörper nachgewiesen werden (Abbildung 36).

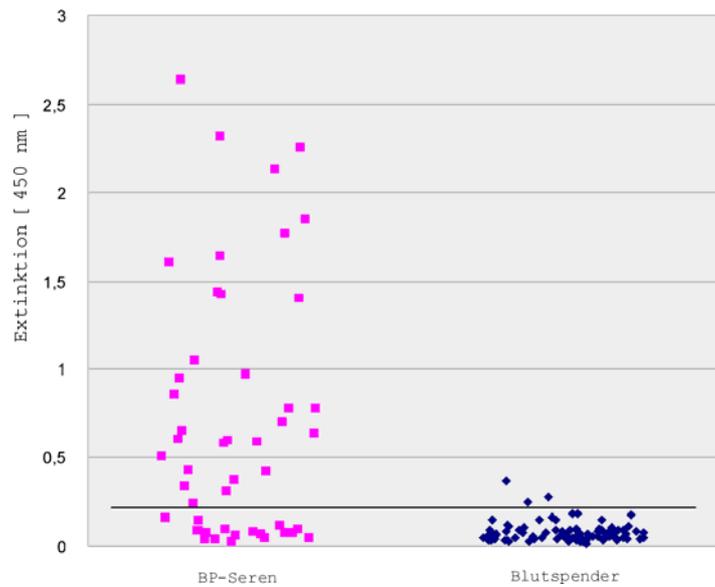
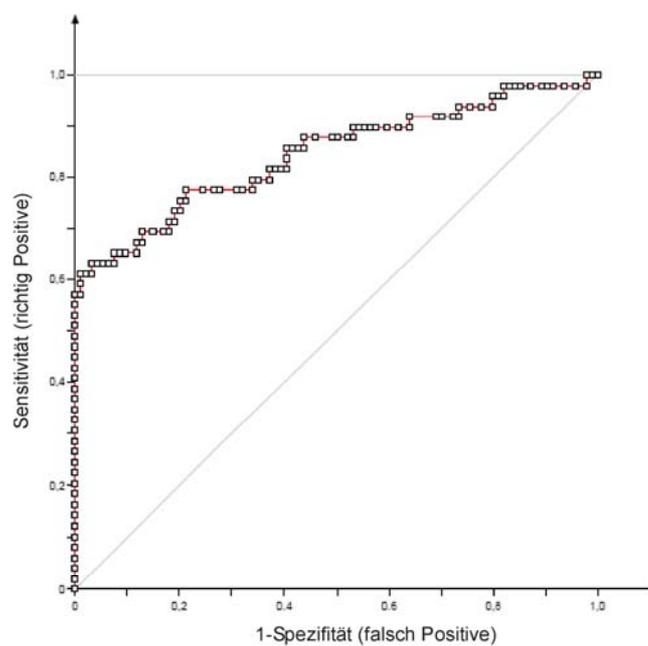


Abbildung 36: Nachweis der Antikörper in Seren von Patienten mit BP und Seren von Blutspendern (IgG, 1:101). Der ermittelte Cut-off lag bei einer Extinktion von 0,19, gemessen bei 450 nm (schwarze horizontale Linie).

Mittels einer ROC-Analyse konnte ein AUC-Wert von 0,845 ermittelt werden (Abbildung 37).



Area under the curve (AUC): 0,845

Abbildung 37: ROC-Analyse des Anti-BP230-C3-ELISA.

12 von 101 Seren der im Lebensalter den BP-Patienten entsprechenden Blutspendern reagierten ausschließlich mit dem Polypeptid BP230-C3 im ELISA. Darunter befanden sich 3 Seren, deren Antikörper in der IIF nachgewiesen werden konnten.

### 3.6 Vergleich der Ergebnisse aus IFT, ELISA und Westernblot

Als diagnostisches Testsystem eignet sich der ELISA mehr als der Westernblot, weil er in Vollautomaten abgearbeitet werden kann und einen größeren Durchsatz von Patientenproben bei geringerem Material-Verbrauch erlaubt. Trotzdem handelt es sich beim Westernblot um das spezifischere System, denn es zeichnet sich dadurch aus, dass die Polypeptide durch die Auftrennung im SDS-Gel zusätzlich aufgereinigt werden.

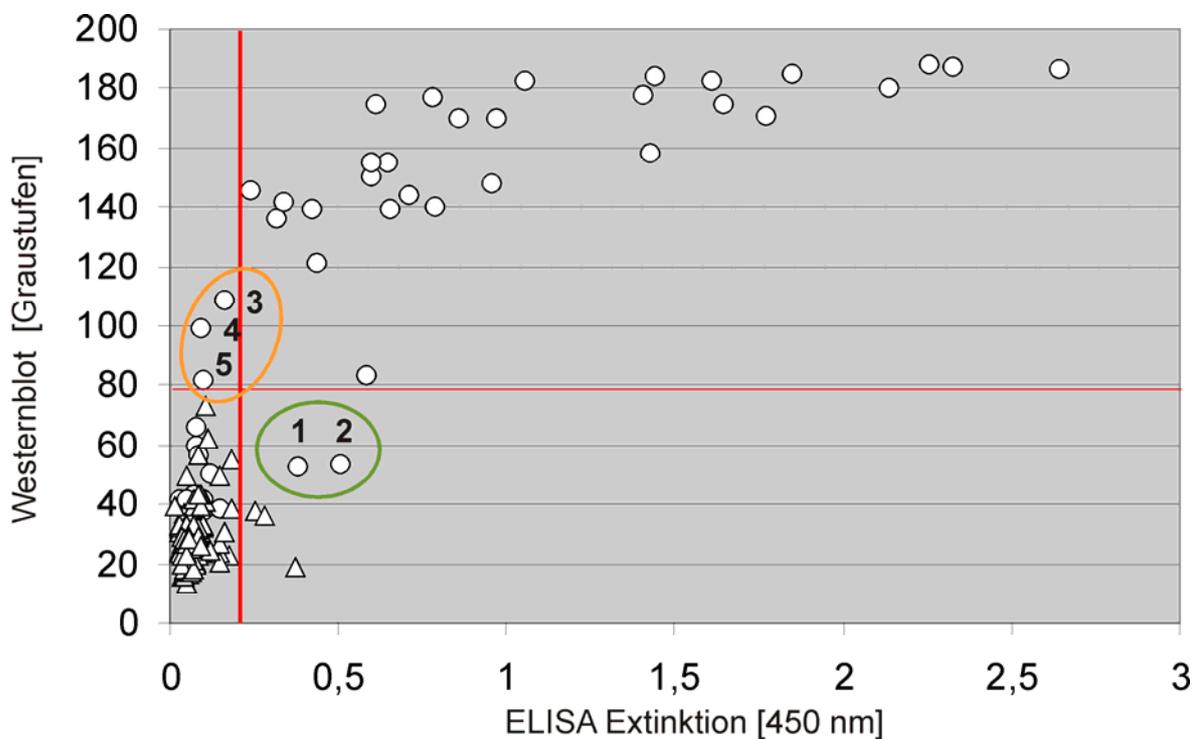
Ob trotz eines Wechsels des Testsystems vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden, ist in Tabelle 8 dargestellt.

*Tabelle 8: Nachweis von anti-BP230 in Seren von 49 BP-Patienten im Anti-BP230-C3-ELISA, im Westernblot und in der IIF. Die Ergebnisse wurden als übereinstimmend angesehen, wenn im Westernblot mindestens Antikörper gegen BP230-C3 und in der IIF gegen BP230-Voll-Länge und/oder -gC nachgewiesen wurden.*

		BP-Kollektiv (n = 49)						
Testsystem	AAk-Nachweis hinsichtlich	n = 23	n = 6	n = 2	n = 2	n = 2	n = 1	n = 13
ELISA	anti-BP230-C3	+	+	+	-	-	-	-
Westernblot	zumindest anti-BP230-C3	+	+	-	+	-	+	-
IFT	anti-BP230gC, -Voll-Länge (Einzel oder in Kombination)	+	-	-	+	+	-	-

In 23 Seren von BP-Patienten konnten mit den drei Testsystemen anti-BP230-C3-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. In 6 Seren erfolgte dieser nur durch Westernblot und ELISA und in 2 ausschließlich durch den ELISA. Bei 2 Seren konnten im Westernblot und im IFT, bei 2 im IFT und bei einem weiteren im Westernblot anti-BP230-Antikörper nachgewiesen werden.

Die Extinktionen (450nm) im ELISA lagen mit 0,5 und 0,4 Einheiten (grüner Kreis, Abbildung 38) deutlich über dem Cut-off.



- positiv hinsichtlich BP230-
- (1) -C3 (ELISA)
  - (2) -C3 (ELISA), -R2 (WB)
  - (3) -C3 (WB)
  - (4) -C3 (WB), -N2, -R2, -C1 (WB), -Voll-Länge, -gN (IFT)
  - (5) -C3 (WB), N2 (WB), -Voll-Länge, -gN (IFT)

Abbildung 38: Nachweis von Antikörpern enthalten in 49 BP-Seren und 94 Seren von Blutspendern gegen BP230-C3 im Westernblot und im ELISA (Cut-offs in rot, Seren aus dem Blutspender-Kollektiv als Dreiecke, Seren aus dem BP-Kollektiv als Kreise dargestellt). Orange sind die Seren markiert, die im Westernblot, aber nicht im ELISA mit BP230-C3 reagierten, in grün diejenigen, die im Anti-BP230-C3-ELISA, aber nicht im Westernblot mit diesem Polypeptid reagierten.

Trotzdem ein Wechsel des Testsystems vorgenommen wurde, konnten weitestgehend konforme Ergebnisse erzielt werden. In 3 Seren konnten Antikörper gegen BP230-C3 nachgewiesen werden, wenn das Polypeptid im Westernblot eingesetzt wurde (orangefarbener Kreis, Abbildung 38) und nicht mit BP230-C3 im ELISA. Im Gegensatz zum Westernblot zeichnete sich der ELISA durch einen größeren Messbereich aus.

### **3.7 Vergleich des Anti-BP230-C3-ELISA mit dem alternativen Testsystem**

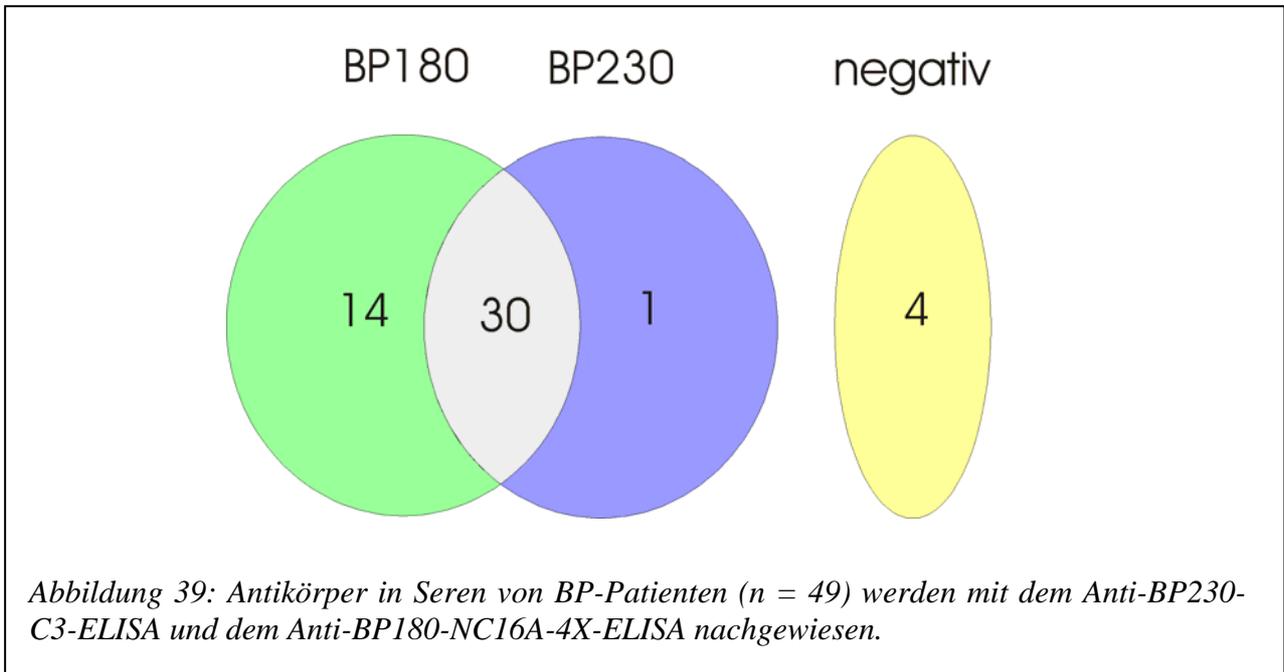
Der einzige zu Beginn dieser Arbeit kommerziell erhältliche BP230-ELISA war von der Firma MBL (Matriotech GmbH, Freiburg). Mit Hilfe dieses Testsystems wurden die Seren aus dem BP-Kollektiv und des Blutspender-Kollektivs 1 auf anti-BP230-Antikörper untersucht. Es zeigte sich bei 31 Seren eine positive Reaktion im kommerziellen Testsystem bei einer Spezifität von 99%. 29 davon waren auch im Anti-BP230-C3-ELISA (Spezifität 97%) positiv. Die beiden Seren, in denen ausschließlich mit dem BP230-ELISA (MBL) Antikörper nachgewiesen werden konnten, zeigten nur im IFT eine Reaktion mit pTriEx-1-BP230-Voll-Länge transfizierten Zellen, -N2a und -R2 im Westernblot bzw. mit BP230-Voll-Länge und -BP230gN transfizierten Zellen, -N2, -R2, -C1 und -3 im Westernblot.

### **3.8 Komplettierung des Anti-BP180-NC16A-4X-ELISA (EUROIMMUN AG)**

Zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen die NC16A-Domäne von BP180 in Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid kann der Anti-BP180-NC16A-4X-ELISA der Firma EUROIMMUN AG eingesetzt werden. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob der zusätzliche Einsatz des Anti-BP230-C3-ELISA zu einer Steigerung der Sensitivität bei gleichbleibender Spezifität führen würde.

Die Seren aus dem BP-Kollektiv wurden mit dem Anti-BP180-NC16A-4X-ELISA inkubiert, die Seren aus dem Kollektiv der Blutspender wurden nicht untersucht, denn nach Angaben des Herstellers besitzt das Testsystem eine Spezifität von 97,9% bei einer Sensitivität von 89,8%. In 44 der 49 (89,8%) Seren aus dem BP-Kollektiv konnten anti-BP180-Antikörper

nachgewiesen werden. In 30 davon konnten zusätzlich anti-BP230-Antikörper im Anti-BP230-C3-ELISA bestimmt werden (Abbildung 39).

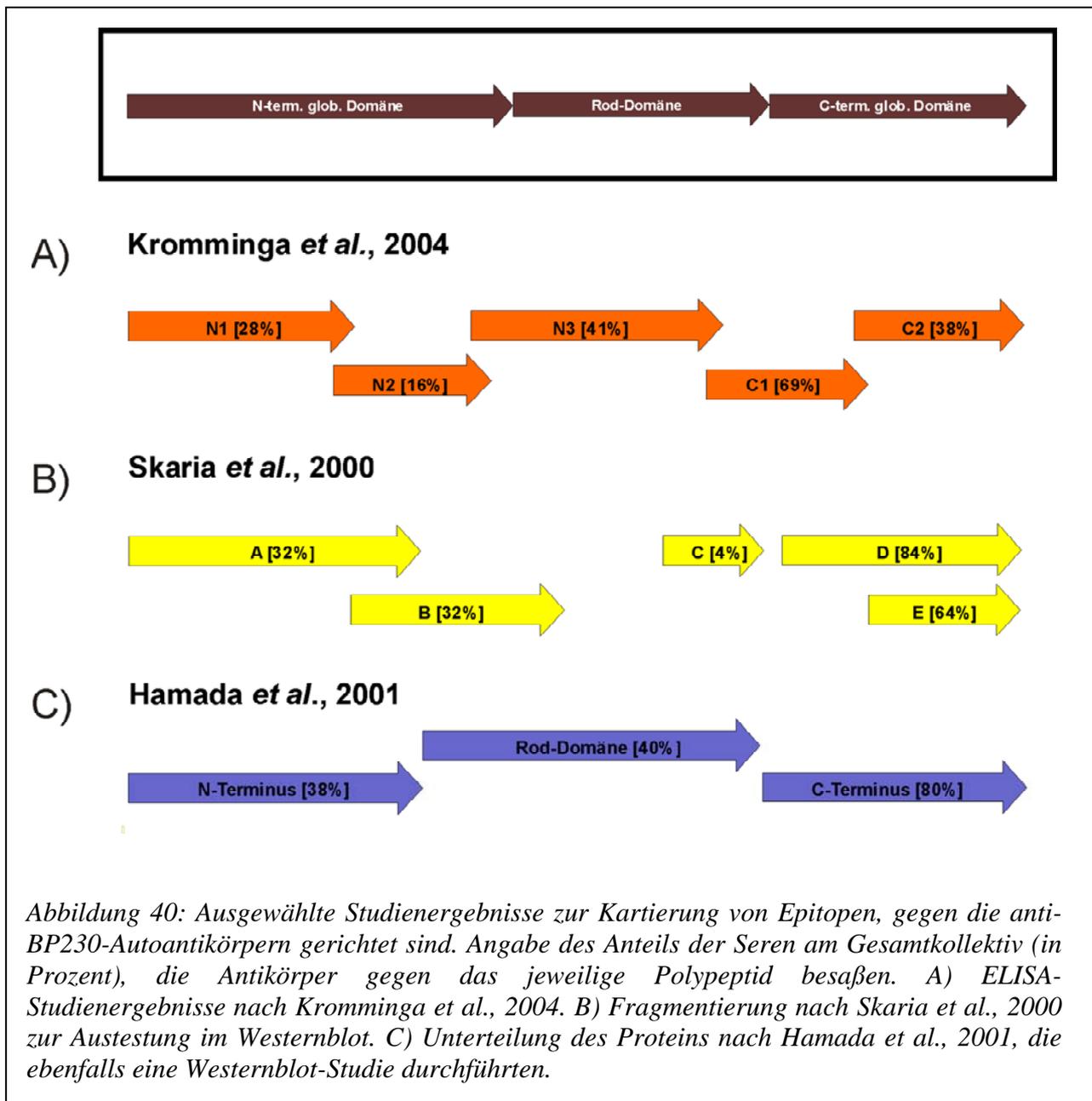


In 14 Seren konnten ausschließlich anti-BP180-Antikörper, in einem Serum nur anti-BP230-Antikörper gefunden werden. Die Reaktion dieses Serums war in der IIF gegen die C-terminale globuläre Domäne des Polypeptids gerichtet. Im Westernblot erfolgte der Nachweis der Antikörper mit den Polypeptiden BP230-C2 und -C3. 4 von 49 Seren wiesen weder Antikörper gegen BP180, noch gegen BP230 in diesen Systemen auf. Die parallele Anwendung von Anti-BP180-NC16A-4X-ELISA und dem prototypischen Anti-BP230-C3-ELISA stellen eine nützliche Kombination dar, um die Diagnostik vom bullösen Pemphigoid zu verbessern.

## 4 Diskussion

Das bullöse Pemphigoid (BP) ist die häufigste blasenbildende Autoimmundermatose. Die Anzahl der jährlichen Neuerkrankungen liegt bei 7 bis 18 pro 1 Mio. Einwohner (Bernard *et al.*, 1995, Zillikens *et al.*, 1995), wobei eine Bevorzugung des männlichen Geschlechts zu verzeichnen ist. Für die Gruppe der über 90-Jährigen liegt die Inzidenz bei 400 Neuerkrankungen pro 1 Mio. Einwohner und Jahr (Jung *et al.*, 1999). Klinisch zeichnet sich das BP durch pralle, flüssigkeitsgefüllte Blasen aus, selten sind die Schleimhäute betroffen (Zillikens *et al.*, 1996). Meist klagen die Patienten über ausgeprägten Juckreiz. Die Erkrankung kann sich auch ohne Blasenbildung z. B. in Form eines Ekzems manifestieren (Wever *et al.*, 1995).

Für die positive Diagnostizierung eines BP trägt der erfolgte Nachweis von IgG und/oder C3 in der direkten Immunfluoreszenz (DIF) im Bereich der Junktionszone zwischen Epidermis und Dermis maßgeblich bei. Dazu sollte eine Biopsie gesund erscheinender Haut neben der Blase entnommen werden (Kasperkiewicz *et al.*, 2007, Schmidt *et al.*, 2009). Zusätzlich können die Antikörper im Serum der Patienten bestimmt werden. Für die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) wird humane Haut (Spalthaut) als Substrat verwendet, bei der durch Inkubation in 1 molarer Kochsalzlösung ein Spalt zwischen Epidermis und Dermis erzeugt wurde. Je nach Lokalisation der an der Spalthaut gebundenen Antikörper können so verschiedene Typen der Pemphigoid-Erkrankungen voneinander unterschieden werden: beim bullösen Pemphigoid erfolgt die Antikörperbindung z. B. im Dach der Blase (epidermaler Anteil). Ist der Verdacht auf ein bullöses Pemphigoid gefestigt, stehen monospezifische Testsysteme wie Westernblot und ELISA zur Verfügung, mit Hilfe derer die Bindung spezifischer Antikörper an die Zielantigene BP180 und BP230 (Zillikens *et al.*, 1999) nachgewiesen werden können. Für Antikörper gegen BP180 konnte eine pathogenetische Relevanz bereits gezeigt werden (Liu *et al.*, 1993, Schmidt *et al.*, 2000, Büdinger *et al.*, 1995). Für BP230 wurde diese bisher nicht bewiesen. Es gibt einige Veröffentlichungen, die sich mit der Identifizierung von Epitopen für Autoantikörper aus Seren von Patienten mit BP auf BP230 befassen (z. B. Kromminga *et al.*, 2004, Skaria *et al.*, 2000 und Hamada *et al.*, 2001, Abbildung 40). Dazu wurden die für Teilbereiche des Proteins kodierenden Sequenzabschnitte in Bakterien oder in Insektenzellen exprimiert, aufgereinigt und in monospezifischen Tests (Westernblot oder ELISA) eingesetzt.



Es konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass die Mehrzahl der durch die Autoantikörper gebundenen Epitope im C-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert sind (Gaucherand *et al.*, 1995, Ide *et al.*, 1995, Komminga *et al.*, 2004). Doch bisher lag die Prävalenz der gebundenen anti-BP230-Antikörper in den Studien mit Seren von BP-Patienten deutlich unter 100%. Gründe dafür könnten neben einer falsch gestellten Diagnose das Fehlen von für die Autoantikörperbindung relevanter antigener Determinanten, z. B. konformationeller Epitope im Testsystem sein. Hinweise auf eine weit höhere Prävalenz lieferten die Studien von Stanley *et al.*, 1988 und Mueller *et al.*, 1991. Sie präzipitierten aus humanen, kultivierten Keratinozyten ein etwa 230 kD Protein mit bis zu 100% (9/9 bzw. 36/37) der BP-Seren. Die Immunpräzipitation bietet gegenüber z. B. dem Westernblot den

Vorteil, dass der Nachweis der Proteine in einem *in vivo* ähnlichem Milieu erfolgt. Andererseits können sich die Polypeptide auch durch den Zellaufschluss verändern oder abgebaut werden. Ferner besteht die Möglichkeit, dass der Antikörper mit einem Interaktionspartner des Zielproteins und nicht mit diesem selbst interagiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde BP230 rekombinant in Säugerzellen hergestellt und im IFT, der annähernd *in vivo* Bedingungen liefert, eingesetzt. Die Ergebnisse sollten Aufschluss über die Prävalenz dieser Antikörper in BP-Seren geben. Zusätzlich wurde der diagnostische Einsatz angestrebt, um die Analytik zu erleichtern und ein alternatives Substrat zur bislang verwendeten Spalthaut zur Verfügung zu stellen.

Es gibt bisher keine Publikation, in der die rekombinante Expression des 308 kD BP230-Voll-Längen-Proteins beschrieben ist. Kromminga *et al.*, 2004 exprimierten ein entsprechendes Konstrukt in Insektenzellen, konnten es allerdings nicht als Zielantigen für einen ELISA verwenden, weil die Ausbeute an rekombinantem Zielprotein zu gering war.

#### **4.1 Entwicklung von BP230-Biochip-Mosaiken**

Eine Innovation der EUROIMMUN AG ist die Entwicklung der Biochip-Technologie zur Standardisierung und Modernisierung der indirekten Immunfluoreszenz. Dazu werden z. B. kultivierte Zellen auf chemisch aktivierte Deckgläser aufgebracht und auf der Oberfläche fixiert. Anschließend werden die Deckgläser maschinell in millimetergroße Fragmente, die so genannten Biochips, unterteilt. Dadurch lassen sich bis zu mehreren tausend Biochips aus einem Deckglas (100 x 60 mm) gewinnen. Es können bis zu 15 unterschiedliche Chips in einem Testfeld kombiniert werden. Auf einem Objektträger befinden sich 5 oder mehr Biochip-Mosaiken (Abbildung 41), die jeweils mit dem Probenmaterial eines Patienten in einem Schritt inkubiert werden können. Die gewonnenen Ergebnisse sind zu 100% vergleichbar.



Abbildung 41: Beispiel für einen Objektträger mit 5 Inkubationsfeldern für 5 Patienten-Seren.

Transfizierte Zellen werden für die indirekte Immunfluoreszenz von der EUROIMMUN AG im Bereich der Autoimmundiagnostik bereits vielfach eingesetzt, z. B. bei der Bestimmung von Antikörpern gegen die NR1-Untereinheit des Glutamatrezeptors zur Diagnostik der Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis (Dalmau *et al.*, 2007).

Standardmäßig wird für die BP-Diagnostik Gewebesubstrat (humane Spalthaut, Abbildung 42) eingesetzt, das lediglich Hinweise auf das Vorhandensein von für BP relevanter Antikörper liefert. Eine Aussage, woran die Bindung der Autoantikörper erfolgte, kann nicht getroffen werden. Im Gegensatz zu Gewebesubstraten bieten transfizierte Zellen den Vorteil, dass das Polypeptid spezifisch gebunden und nachgewiesen werden kann.

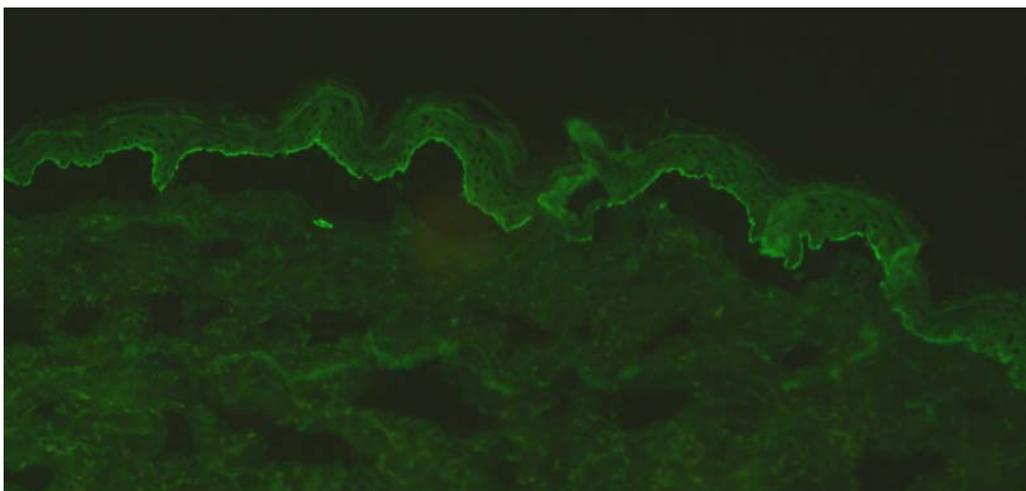


Abbildung 42: Fluoreszenz der epidermalen Basalmembran im Blasendach humaner Spalthaut nach Inkubation mit einem Serum eines BP-Patienten, nachgewiesen mit anti-human-IgG-FITC.

Es bot sich an, die N- und die C-terminale globuläre Domänen einzeln in Anlehnung an die Domänenstruktur des Proteins zusätzlich zum BP230-Voll-Längen-Konstrukt zu exprimieren, denn es wird angenommen, dass es sich bei Domänen um autonome Faltungseinheiten handelt (Lodish *et al.*, 2001). Dadurch sollten die durch die Autoantikörper gebundenen Epitope weiter charakterisiert und die Antigenmenge im Test erhöht werden, um eine Steigerung der analytischen Sensitivität zu erlangen und auch geringe Antikörpertiter in Seren von Patienten mit BP nachweisen zu können.

Folgende mit den rekombinanten Zellsubstraten beschichtete Biochips wurden miteinander in Biochip-Mosaiken kombiniert: BP230-Voll-Länge, BP230gN (N-terminale globuläre Domäne) und BP230gC (C-terminale globuläre Domäne), sowie untransfizierte Zellen als Kontrolle (Abbildung 43). Weil die Transfektionsrate zwischen 15 und 40% lag, boten die nicht transfizierten Zellen innerhalb eines Biochips eine weitere Kontrolle, die eine mögliche Änderung des Expressionsprofils berücksichtigte.



Abbildung 43: Das Biochipmosaik setzte sich aus BP230-Voll-Länge, BP230gC und BP230gN produzierenden HEK293-Zellen, sowie nicht transfizierten Zellen zusammen.

Die Konstrukte wurden in Säugerzellen (HEK293) exprimiert, wodurch höchstwahrscheinlich Sekundär- und Tertiärstrukturen ausgebildet und konformationelle Epitope dargestellt werden konnten. Ferner waren posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen und Disulfidbrücken möglich. Durch die Wahl der Immunfluoreszenz als Testsystem entfiel eine Aufreinigung der Proteine und damit die Notwendigkeit der Verwendung evtl. denaturierender Reagenzien. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund des Fehlens der mit BP230 interagierenden Proteine in der Haut die Konformation negativ beeinflusst wurde. Der Nachweis von BP230 spezifischen Antikörpern wurde nur als valide angesehen, wenn auf dem untransfizierten Kontrollsubstrat keine Antikörperbindung stattfand oder ein anderes Fluoreszenzmuster nachgewiesen wurde.

## **4.2 Ermittlung der Grundgesamtheit von anti-BP230-Antikörpern**

Für die Studie wurden ein Kollektiv aus 49 Seren von Patienten mit einem durch direkte Immunfluoreszenz gesicherten BP, 11 Seren von Patientinnen mit Pemphigoid gestationis (PG), 16 Seren mit Pemphigus vulgaris (PV) und 94 von gesunden Blutspendern verwendet. Das PG tritt während oder kurz nach der Schwangerschaft auf und ist dadurch gekennzeichnet, dass es nur selten zur Blasenbildung kommt und die Krankheit wieder vollständig verheilt (Sitaru *et al.*, 2004). Es könnte mit einer frühen Phase des BP verglichen werden.

Zusätzlich wurde ein Kollektiv aus 101 Seren von Patienten im Alter von über 70 Jahren mit nicht-inflammatorischen Autoimmunkrankheiten der Haut auf anti-BP230-Antikörper untersucht. Hasler *et al.* beschrieben 2005, dass sich das Immunsystem im Alter verändert, was u. a. durch eine vermehrte Bildung von Autoantikörpern charakterisiert ist. Ob auch anti-BP230-Antikörper darunter sind, und welche Bereiche sie auf dem Protein binden, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Bei einer Spezifität von 100% bezogen auf das Kollektiv gesunder, junger Blutspender, konnten in 55% (27/49) der BP-Seren anti-BP230-Antikörper nachgewiesen werden (Tabelle 9).

*Tabelle 9: Übersichtstabelle zu den Ergebnissen aus der IFT-Studie mit den BP230 produzierenden Zellen als Substrat. Abkürzungen: bullöses Pemphigoid (BP), Pemphigoid gestationis (PG), Pemphigus vulgaris (PV).*

Anzahl der Seren, in denen ein positiver anti-BP230-Antikörper-Nachweis erfolgte / Seren-Anzahl je Kollektiv	Bezeichnung Seren-Kollektiv
27/49	BP
1/11	PG
0/16	PV
0/94	junge, gesunde BS
7/101	Patienten mit anderen Hautkrankheiten > 70 Jahre

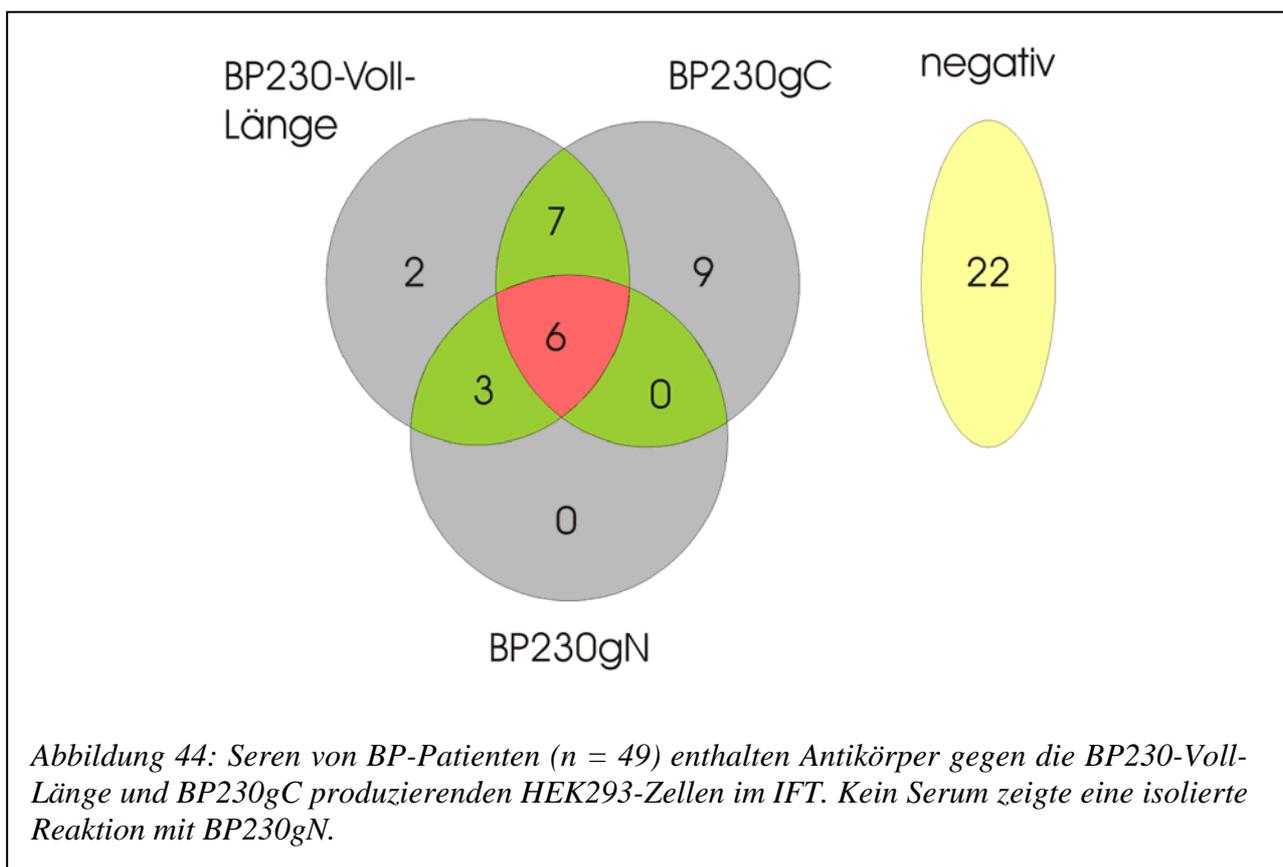
Es konnte nicht beobachtet werden, dass Seren, die Antikörper gegen mehrere BP230-Fragmente enthielten, mit einem dieser Bereiche besonders stark reagierten. Das Serum einer Patientin mit PG enthielt Antikörper gegen die BP230-Voll-Länge und -gN produzierende Zellen. Möglicher Weise lag bei der Patientin eine besondere Schwere der Erkrankung vor, denn die Entzündungsreaktion soll durch anti-BP230-Antikörper verstärkend beeinflusst werden (Sitaru *et al.*, 2004). In den Seren der PV-Patienten konnten keine anti-BP230-Antikörper nachgewiesen werden. Diese Erkrankung wird in der Literatur mit Autoantikörpern gegen Dsg1 und Dsg3 in Verbindung gebracht (Amagai *et al.*, 1991, 1999, Stanley *et al.*, 1982, Hashimoto *et al.*, 1995) und nicht mit Antikörpern gegen BP230.

In 7 Seren von Patienten mit nicht autoimmunen Krankheiten der Haut im Alter über 70 Jahren konnten anti-BP230-Antikörper gemessen werden, wobei sich keine Präferenz für bestimmte Proteindomänen herausstellte. Damit konnte gezeigt werden, dass im Alter

gegenüber dem Kollektiv gesunder, junger Blutspender vermehrt anti-BP230-Autoantikörper gebildet werden. Auch Desai *et al.*, 2008 detektierten mittels Westernblot eines epidermalen Extrakts in 59% der getesteten Seren von gesunden, meist älteren (50 - 70 Jahre) Personen anti-BP180- und/oder anti-BP230-Antikörper. Im ELISA mit der NC16A-Domäne als Zielprotein reagierte aber keine der Proben positiv, wodurch gezeigt werden konnte, dass Antikörper gegen BP180 und BP230 gebildet werden, aber für die Erkrankung wahrscheinlich nicht von Bedeutung sind. Im Rahmen einer prospektiven Studie sollte die Klinik dieser Patienten (7/101) dringend verfolgt werden, um diese Vermutung zu belegen.

### 4.3 Differenzierung der anti-BP230-Antikörperbindung innerhalb des BP-Seren-Kollektivs

27 von 49 BP-Seren enthielten anti-BP230-Antikörper. Bei 18 waren diese gegen die BP230-Voll-Länge und weitere BP230-Teil-Polypeptide gerichtet. Unter ihnen waren 3 Seren, bei denen die durch die Antikörper gebundenen Epitope im C-terminalen Bereich und 7, bei denen sie im C-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert waren (Abbildung 44).



Die Antikörper in 2 Seren, die nur mit der BP230-Voll-Länge nachgewiesen werden konnten, banden sich vermutlich an Epitope der Rod-Domäne. Für BP180 konnte gezeigt werden (Büdinger *et al.*, 1998), dass BP-Patienten bevorzugt einen bestimmten HLA-Typ besitzen. Auch bei Gesunden dieses Typs konnte nach Stimulation mit dem Antigen eine T-Zell-Antwort ausgelöst werden. In der Annahme, dass alle die Patienten, deren Antikörper mit dem C-terminalen Bereich von BP230 reagierten einen identischen HLA-Typ haben, wäre es denkbar, dass die, die Antikörper gegen den N-terminalen Bereich oder die Rod-Domäne aufwiesen, von einem anderen Typ sind.

In 9 Seren konnten Antikörper gegen BP230gC, aber nicht gegen die BP230-Voll-Länge nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis war fraglich, denn die BP230-Voll-Länge schließt BP230gC mit ein. Es konnte ausgeschlossen werden, dass eine der beiden globulären Domänen im BP230-Voll-Längen-Protein durch alternatives Spleißen oder interne Translationsinitiation entfernt wurde, da ein Teil der 27 positiven Seren Antikörper gegen BP230-Voll-Länge und BP230gN besaß, ein anderer Teil Antikörper gegen die -Voll-Länge und -gC. Es konnte sichergestellt werden, dass die Sequenz im richtigen Leserahmen vorlag, weil das Protein mit dem anti-His-Antikörper im IFT nachgewiesen werden konnte und sich der His-Tag<sup>TM</sup> am C-Terminus der Sequenz befindet.

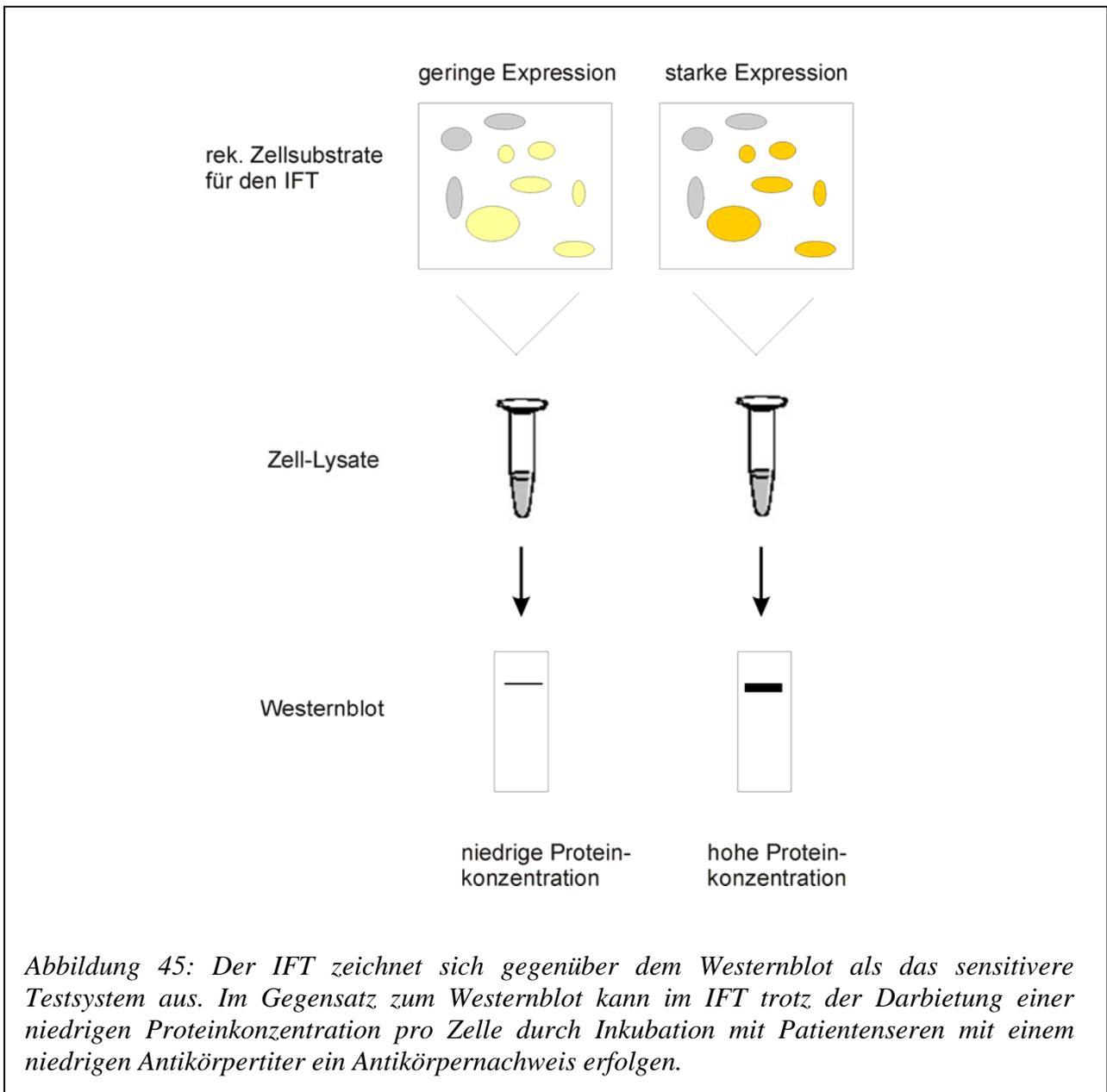
Ein proteolytischer Abbau von Teilbereichen des Proteins wurde im Folgenden analysiert (siehe 4.4).

#### **4.4 Expressionsanalyse des BP230-Voll-Längen Polypeptids**

Von den transfizierten Zellen wurden Lysate hergestellt und im Westernblot auf ihre Reaktivität mit repräsentativen Seren aus dem BP-Kollektiv analysiert. Mit keinem der Polypeptide wurden anti-BP230-Antikörper im Westernblot nachgewiesen (ohne Abbildung). Außerdem konnten die Polypeptide nicht durch eine Inkubation mit dem monoklonalen anti-His-Antikörper detektiert werden.

Das Ergebnis deutet darauf hin, dass die gebildete Proteinsynthesemenge an Zielprotein für einen anti-BP230-Antikörpernachweis im Westernblot zu gering war und der Hintergrund der untransfizierten Zellen zu hoch war. Der Nachweis konnte selbst mit Seren mit einem höheren Antikörpertiter nicht erfolgen. Im Gegensatz dazu war es im IFT möglich, die

Antikörperbindung (z. B. an BP230gC) auch bei einer niedrigen Gesamtexpression anhand einzelner Zellen nachzuweisen. Der IFT stellte sich gegenüber dem Westernblot als das sensitivere System dar (Abbildung 45).



Dass Antikörper mit BP230gC aber nicht mit der BP230-Voll-Länge reagierten, könnte auf eine molare Überrepräsentation von BP230gC im Vergleich zur BP230-Voll-Länge zurückzuführen sein, denn es ist anzunehmen, dass bei Auslastung des Translationssystems stets die gleiche Menge an Protein gebildet wird.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten rekombinanten Zellen für die indirekte Immunfluoreszenz stellen ein nützliches Substrat für die Analytik der Expressionsprofile bei unterschiedlichen klinischen Manifestationen des bullösen Pemphigoids dar. Auch für den diagnostischen Einsatz bieten sie eine lohnende Alternative zu den bisher verwendeten Gewebesubstraten, denn sie erlauben eine Differenzierung zwischen den einzelnen Zielantigenen. Dabei empfiehlt sich die Messung der Antikörper mit Zellen, die gleichzeitig die BP230-Voll-Länge und BP230gC exprimieren (Abbildung 46), weil dadurch eine mögliche Überrepräsentation des N-terminalen Bereichs kompensiert würde.

BP230-Voll-Länge + BP230gC	BP180
Dsg1	Dsg3

*Abbildung 46: Eine Kombination aus HEK293-Zellen, die mit den für BP230, BP180, Dsg1 oder Dsg3 transfiziert wurden, stellen ein überragendes Testsystem zur Diagnostik bullöser Autoimmundermatosen dar. Für BP230 wird dazu eine Mischtransfektion mit pTriEx-1-BP230-Voll-Länge und -BP230gC empfohlen.*

Ein weiterer Ansatz ist die Entwicklung eines umfassenden Mosaiks für die Bestimmung dermatologisch relevanter Autoantikörper, im dem Dsg1, Dsg3, BP180 und BP230 als rekombinante Polypeptide miteinander kombiniert werden.

## 4.5 BP230-Epitopmapping

Die indirekte Immunfluoreszenz mit rekombinanten Zellen zur Bestimmung von anti-BP230-Antikörpern in Seren von BP-Patienten stellt eine angemessene Ausweichmöglichkeit zu den bisher verfügbaren ELISA dar (Kromminga *et al.*, 2000, Yoshida *et al.*, 2006).

Die Grundgesamtheit der anti-BP230-Antikörper konnte allerdings anhand des BP230-Voll-Längen-Proteins nicht hinreichend erfasst werden. Es wurde davon abgesehen, das Polypeptid in einem anderen System in einer höheren Konzentration einzusetzen, weil es dazu hätte aufgereinigt werden müssen und möglicher Weise seine authentische Konformation verloren hätte.

In der Literatur ist bisher nicht beschrieben, dass konformationelle Epitope und Modifikationen des BP230 eine entscheidende Rolle spielen. Aus diesem Grund sollte zur Messung aller linearen Epitope auf BP230 eine feinmaschige Kartierung der Voll-Länge durchgeführt werden. Zwölf Plasmide, die für unterschiedliche Teilbereiche von BP230 codierten, wurden in Bakterien exprimiert und die rekombinanten Proteine aufgereinigt. Durch diese Eingrenzung sollte die analytische Sensitivität des Tests gesteigert werden. Die Polypeptide wurden denaturierend aufgereinigt, wodurch eine Kopplung an einen GST-Tag nicht erforderlich war. Der stattdessen verwendete His-Tag<sup>TM</sup> war mit 1,1 kD gegenüber dem GST-Tag vergleichsweise klein (24 kD) und nicht bakteriellen Ursprungs, womit immunogene Eigenschaften des Tags weitestgehend ausgeschlossen werden konnten. Für den immunologischen Test wurden die Polypeptide in einer SDS-PAGE separiert und im Westernblot eingesetzt. Auf diese Weise konnte ein Reinheitsgrad von über 95% bezogen auf das einzelne Polypeptid erreicht werden.

Für die Untersuchung der Antikörperreaktion gegen die Teilbereiche von BP230 stand das bereits in der Studie im IFT verwendeten Kollektiv aus 49 Seren von BP-Patienten, 11 Seren von PG-Patienten, 16 von PV-Patienten und 94 Seren von gesunden, jungen Blutspendern zur Verfügung. Mit dem Fragment BP230-C3 konnten in 32 Seren anti-BP230-Antikörper nachgewiesen werden. Das entspricht den bisher in der Literatur veröffentlichten Daten (Abbildung 40). Die Antikörper in vier weiteren Seren waren gegen Epitope außerhalb dieses Bereichs gerichtet und waren eventuell unspezifisch für das bullöse Pemphigoid. Es ist auch denkbar, dass diese Antigen determinante von einem anderen HLA-Typ erkannt wird, und dadurch eine andere Antikörperreaktion hervorruft.

Der positive Nachweis der Antikörper bei dem PG-Serum im IFT konnte durch den Westernblot bestätigt werden.

Unter den 16 PV-Seren konnten in 3 anti-BP230-R2-Antikörper nachgewiesen werden, gerichtet gegen ein Fragment der Rod-Domäne. Weil anti-BP230-Antikörper im Allgemeinen keine klinische Bedeutung beim PV haben, könnte es darauf hindeuten, dass die Reaktionen gegen BP230-R2 unspezifisch bei der Analytik von Antikörpern in BP-Seren sind.

Bei 2 der 3 Seren, die anhand der IFT-Ergebnisse nur Antikörper gegen N-terminale Epitope auf BP230 enthielten und bei einem dritten Serum, das ohne positiven Antikörpernachweis im IFT blieb, konnten anti-BP230-C3-Antikörper nachgewiesen werden. Eventuell banden diese Antikörper ausschließlich an lineare Epitope, die in der indirekten Immunfluoreszenz nicht zugänglich waren.

Mit einem Wechsel von Expressions- und Testsystem konnte eine Steigerung der Sensitivität gemessen am BP230-C3-Polypeptid um 10% erzielt werden (von 55% auf 65%) bei vergleichbarer Spezifität (100% und 98,8%). Das Ergebnis steht im Einklang mit der Fachliteratur (z. B. Skaria *et al.*, 2000)

#### **4.6 ELISA mit BP230-C3**

Die Entwicklung eines ELISA basierte auf dem Polypeptid BP230-C3, mit dem die höchste Sensitivität gemessen an dem Kollektiv von Seren von BP-Patienten erzielt werden konnte. Es wurde darauf verzichtet, ein Gemisch aus mehreren Proteinen einzusetzen, denn einzelne Proteine eignen sich erfahrungsgemäß besser, um ein gut reproduzierbares Testsystem zu entwickeln. Der ELISA bietet gegenüber dem Westernblot mehrere Vorteile: er kann in Voll-Automaten abgearbeitet werden, ist gut quantifizierbar und kann zur Titerkontrolle eingesetzt werden.

Der prototypische Anti-BP230-C3-ELISA besaß eine Sensitivität von 63% (31/49) gemessen an den Seren aus dem BP-Kollektiv bei einer Spezifität von 97% (3/94) gemessen an Seren aus einem Kollektiv gesunder, junger Blutspender. Von den 101 Patienten mit Hautkrankheiten über 70 Jahren konnten in 12 Seren anti-BP230-Antikörper nachgewiesen werden, darunter 3, die bereits im IFT positiv waren. Diskrepante Reaktionen können auf eine Rückfaltung des Proteins im ELISA zurückzuführen sein, wodurch sich eine neue Konformation ausbildet. Ferner könnte es sich um eine Reaktion nur gegen lineare Epitope handeln oder auf die höhere Antigen-Konzentration verglichen mit dem IFT zurückzuführen sein.

Für den diagnostischen Einsatz ist die Kombination des Anti-BP230-C3-ELISA und des Anti-BP180-NC16A-4X-ELISA der EUROIMMUN AG empfehlenswert. In 90% (44/49) der BP-Seren konnten anti-BP180-Antikörper gemessen werden. Die zusätzliche Bestimmung der anti-BP230-C3-Antikörper führte zu einer Sensitivitätssteigerung um 2% (ein weiteres BP-Serum positiv). Weitere Studien werden die Signifikanz dieser Ergebnisse belegen müssen. Die Relevanz eines N-terminalen Fragments (Yoshida *et al.*, 2006) ist fraglich, denn dieses führte zu keinen weiteren positiven Ergebnissen im BP-Kollektiv. Ein Vergleich des BP230-ELISA (MBL) führte zu ein weitestgehend übereinstimmenden Ergebnis (31/49, davon 29 gleich). Eine Weiterentwicklung des prototypischen Anti-BP230-C3-ELISA wird unter dem Produktnamen Anti-BP230-CF-ELISA seit Herbst 2009 als CE gekennzeichnetes Diagnostikum der EUROIMMUN AG vertrieben (Abbildung 47).

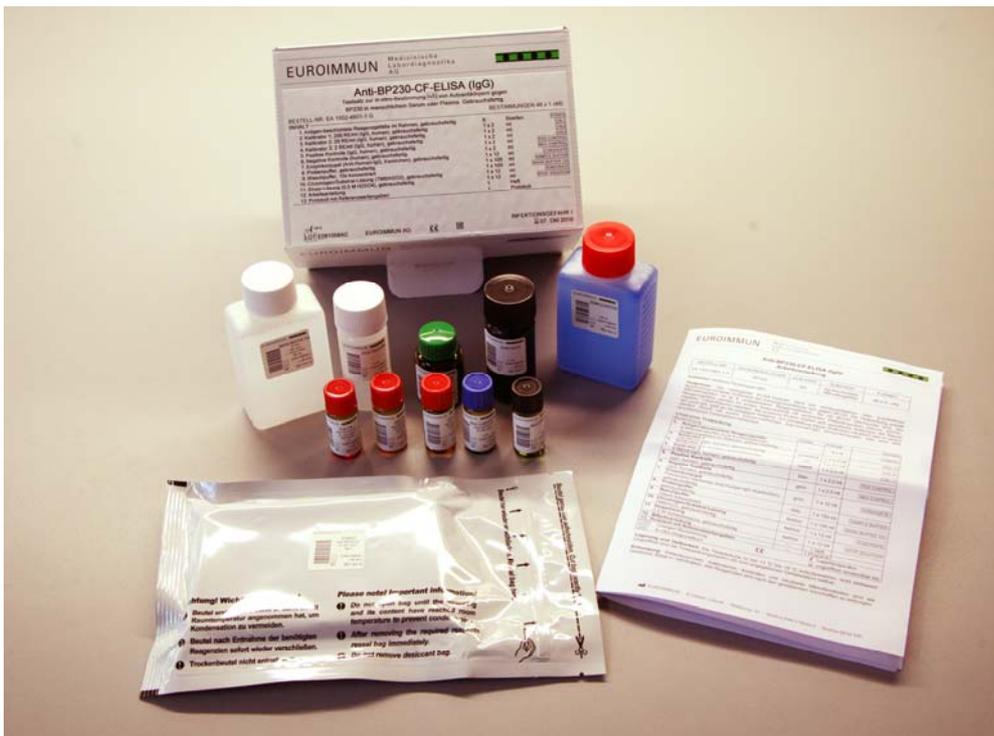
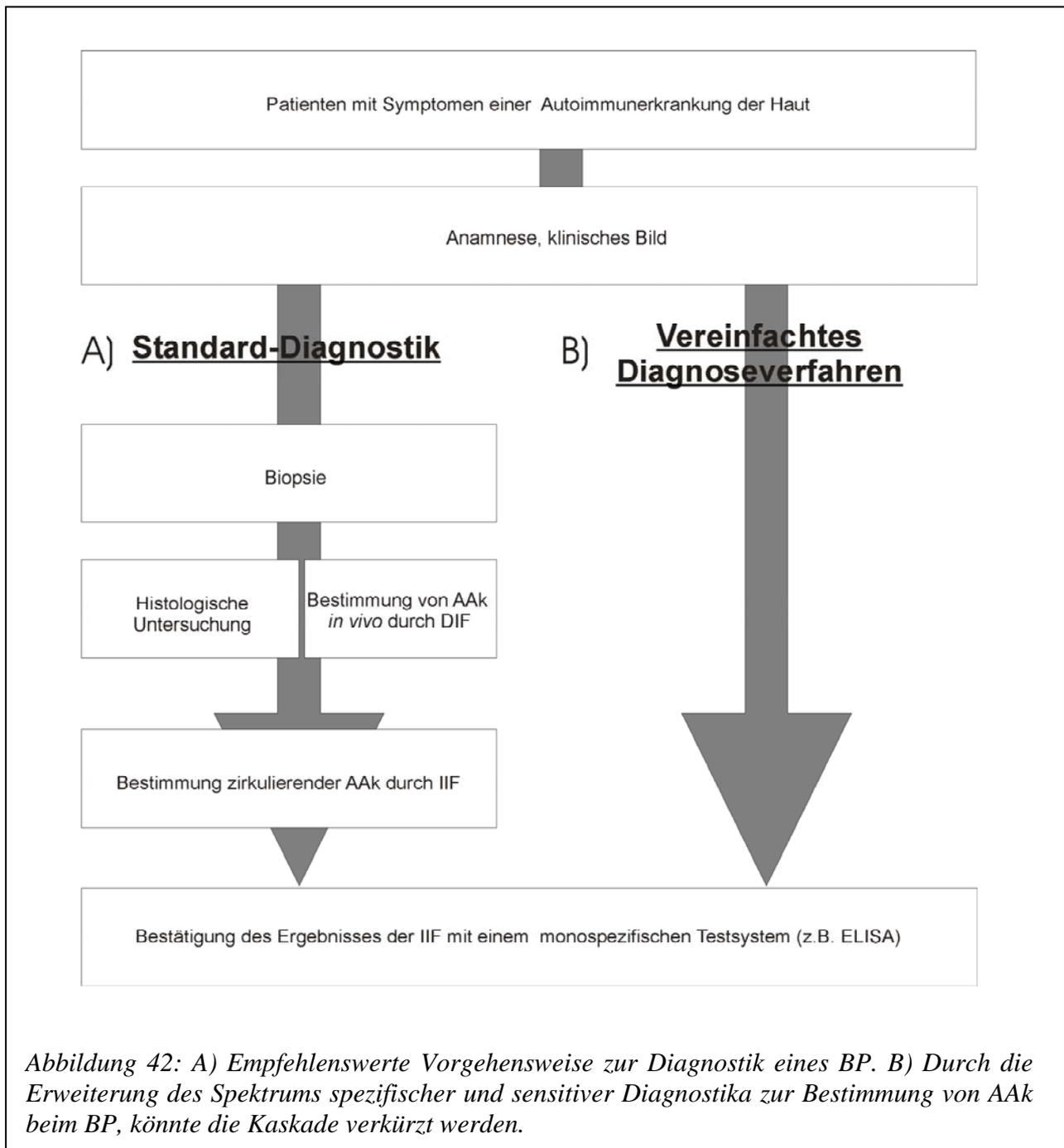


Abbildung 47: Darstellung des Test-Kits des neuen Anti-BP230-CF-ELISA, dessen Prototyp im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelt wurde.

## 4.7 Ausblick

Es wird angestrebt, mit Hilfe von maximal spezifischen und sensitiven *in vitro* Diagnostika schneller zu einem sicheren Ergebnis zu gelangen (Abbildung 48).



Ob durch eine kombinierte Untersuchung der anti-BP180- und anti-BP230-Antikörper im ELISA den Patienten zukünftig eine Haut-Biopsie erspart werden kann, wird sich zeigen.

Besonders für Kinder ist es wünschenswert nicht invasive Diagnoseverfahren zu entwickeln. Daneshpazhooch *et al.*, 2004 analysierten die Blasenflüssigkeit von 25 BP-Patienten mit positiver DIF und/oder Histologie und verglichen die auf Spalthaut gemessenen Antikörpertiter in der Blasenflüssigkeit mit der im Serum. Dabei konnten in 23 Proben Antikörper in beiden Flüssigkeiten gemessen werden, bei jeweils einem weiteren nur in einer. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen gefunden.

Das Biochip-Mosaik mit den rekombinanten Zellsubstraten stellt ein nützliches Testsystem zur Erforschung der Epitopverteilung auf BP230 und ihrer klinischen Relevanz dar. Für den diagnostischen Einsatz ist eine Mischtransfektion mit der BP20-Voll-Länge und -gC für eine maximale Epitopabdeckung empfehlenswert. Der IFT bietet somit eine überlegene Alternative zu Spalthaut.

Sollte sich in Zukunft herausstellen, dass anti-BP230-Antikörper doch eine pathogenetische Bedeutung haben, ist es denkbar, das immobilisierte Antigen BP230-C3 zur Absorption der Autoantikörper einzusetzen. Für die Abtrennung BP180-spezifischer Autoantikörper ist ein therapeutischer Nutzen bereits gezeigt worden (Herrero-Gonzalez *et al.*, 2005, Ino *et al.*, 1997). Ein klinisch einsetzbarer anti-BP180-Absorber befindet sich derzeit in der Entwicklung.

## 5 Zusammenfassung

### Epitopmapping des epidermalen Autoantigens BP230

Das **bullöse Pemphigoid (BP)** ist die häufigste Blasen bildende Autoimmundermatose. Es ist assoziiert mit Autoantikörpern (AAk) gegen Bestandteile der Basalmembran. Als Hauptantigene sind **BP180 und BP230** beschrieben, die im basalen Keratinozyten lokalisiert sind. Für AAk gegen NC16A, die sechzehnte Nichtkollagen-Domäne des BP180, ist eine pathogenetische Relevanz bekannt. BP230 ist ein intrazelluläres Protein und wird untergliedert in eine mittlere stabförmige Domäne (Rod), flankiert von zwei globulären Domänen. Für BP230 ist bisher nicht eindeutig gezeigt worden, welche Epitope zur Erfassung BP230-spezifischer Antikörper von Bedeutung sind.

Bisherige, meist auf denaturierenden BP230 basierenden Testverfahren zur Messung der anti-BP230-Ak sind lediglich aus Teilstücken des Antigens aufgebaut und eignen sich deshalb nicht zur Erfassung der Grundgesamtheit an anti-BP230-Ak. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines neuen Testsystems, das auf dem **authentischen BP230-Voll-Längen Protein basiert und alle anti-BP230-Antikörper in Seren von Patienten mit BP erfasst**. Durch die Verwendung BP230 produzierender Säugerzellen für den indirekten Immunfluoreszenz-Test (IFT) war es möglich, dass sich die AAk sowohl an lineare als auch an konformationelle Epitope binden konnten. Drei cDNA-Konstrukte wurden in Säugerzellen exprimiert: kodierend für die BP230-Voll-Länge, die N-terminale globuläre Domäne (BP230gN) und die C-terminale globuläre Domäne (BP230gC). Im IFT mit den transfizierten Zellen wurde anhand von Seren eines Kollektivs aus 49 BP-Patienten und aus 94 Blutspendern überprüft, ob die zellassozierten BP230-Polypeptide von AAk spezifisch gebunden wurden. Bei einer Spezifität von 100% reagierten 37% (18/49) der Patienten-Seren mit den BP230-Voll-Länge-haltigen Substraten und 45% (22/49) mit den BP230gC-haltigen Zellen. Beide Varianten zusammengenommen lieferten in 55% (27/49) einen positiven Nachweis der AAk-Bindung. Mit den mit BP230gN-haltigen (18%) Zellen stellten sich darüber hinaus keine zusätzlichen positiven AAk-Bindungen ein. Untersuchungen, warum in 9 Seren AAk gegen BP230gC aber nicht die -Voll-Länge hatten, lieferten Hinweise darauf, dass die BP230-Proteinmenge für den Nachweis zu gering war.

Mit **zwölf rekombinanten Polypeptiden wurde untersucht, ob lineare Epitope relevante Zielantigene darstellen und wo diese lokalisiert sind.** Diese wurden in Anlehnung an ein „PepScan“-Verfahren hergestellt. Fünf die N-terminale globuläre Domäne, drei die C-terminale und zwei die Rod-Domäne darstellende Plasmide wurden hinsichtlich ihrer Größe und Expressionsstärke optimiert und in Bakterienzellen exprimiert. Ihre Reaktivität wurde im Westernblot-System mit den Seren von BP-Patienten überprüft. Mit dem reaktivsten Polypeptid BP230-C3, einem 38 kD Protein der C-terminalen Domäne, konnten BP230-AAk bei 32 von 49 (65%) Seren von BP-Patienten (Spezifität 98,9%) nachgewiesen werden.

**Basierend auf BP230-C3 wurde ein ELISA zum Nachweis von anti-BP230-Autoantikörpern entwickelt.** Mit diesem konnten bei 31 der 49 Seren von Patienten mit BP (63%) AAK gegen BP230-C3 nachgewiesen werden (Spezifität 97%), womit bereits der Prototyp mit dem alternativen kommerziellen Testsystem konkurrieren konnte.

Die vorliegende Arbeit bildete den Ausgangspunkt für die Herstellung eines kommerziellen, bereits **CE gekennzeichneten ELISA** als *in vitro* Diagnostikum. Es wird angestrebt, durch die parallele Bestimmung von anti-BP230- und anti-BP180-Ak auf die Entnahme einer Haut-Biopsie zukünftig verzichten zu können. Das entwickelte **Biochip-Mosaik** für den IFT stellt ein nützliches Hilfsmittel für weitere Studien zur Erforschung der Epitopverteilung dar. Sollte sich zeigen, dass Ak gegen BP230 doch pathogenetische Relevanz besäßen, so stünden die entsprechenden Polypeptide für eine Kopplung an Antikörper-Absorptionssäulen zur Verfügung.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alberts B *et al.* Molekularbiologie der Zelle. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. Kga.A, 4. Auflage, 2004.
- Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley J R. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 1991; 67: 869-877.
- Amagai M, Tsunoda K, Zillikens D, Nagai T, Nishikawa T. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: 167-170.
- Avrameas S, Guilbert B. A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. *Eur J Immunol* 1971; 1: 394-396.
- Bastuji-Garin S, Souissi R, Blum L *et al.* Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian woman. *J Invest Dermatol* 1995; 133: 289-293.
- Bernard P, Vaillant L, Labeille B, Bedane C, Arbeille B, Denoeux J P, Lorette G, Bonneblanc J M, Prost C. Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. *Arch Dermatol* 1995; 131: 48-52.
- Borradori L, Sonnenberg A. Hemidesmosomes: roles in adhesion, signalling and human disease. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 647-656.
- Borradori L, Sonnenberg A. Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 411-418.
- Bündiger L, Borradori L, Yee C *et al.* Identification and characterization of autoreactive T cell responses to bullous pemphigoid antigen 2 in patients and healthy controls. *J Clin Invest* 1998; 102: 2082-2089.
- Chimanovitch I, Schmidt E, Messer G *et al.* IgG1 and IgG3 are the major immunoglobulin subclasses targeting epitope within the NC16A domain of BP180 in Pemphigoid gestationis. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 140-142.
- Chorzelski T P, Jablonska S, Beuther E H, Maciejowska E, Jarzabek-Chorzelska M. Herpes gestationis with identical lesions in the newborn. Passive transfer of the disease? *Arch Dermatol* 1976; 112: 1129-1131.
- Chorzelski T P, Jablonska S. IgA linear dermatosis of childhood (chronic bullous disease of childhood). *Br J Dermatol* 1979; 101: 535-542.
- Dalmau J, Gleichman A J, Hughes E G, Rossi J E, Peng X, Lai M, Dessain S K, Rosenfeld M R, Balice-Gordon R, Lynch D R. *Lancet Neurol* 2008; 7(12): 1091-1098.
- Daneshpazhoo M, Shahdi M, Aghaeepoor M, Hasiri G, Chams C. A comparative study of antibody titers of blister fluid and serum in patients with subepidermal immunobullous diseases. *Int J Dermatol* 2004; 43: 348-351.
- Desai N, Allen J, Ali I, Venning V, Wojnarowska F. Autoantibodies to basement membrane proteins BP180 and BP230 are commonly detected in normal subjects by immunoblotting. *Aust J Dermatol* 2008; 49: 137-141.
- Diaz L A, Ratrie H, Saunders W S *et al.* Isolation of a human epidermal cDNA corresponding to the 180-kD autoantigen recognized by bullous Pemphigoid and herpes gestationis sera. *J Clin Invest* 1990; 86: 1088-1094.
- Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Fontao L, Calabresi V, Hofmann S C, Hellmark T, Sebbag N, Pedicelli C, Sera F, Lacour J P, Wieslander J, Bruckner-Tuderman L, Borradori L, Zambruno G, Hertl M. Multicenter prospective study of the humoral autoimmune response in bullous pemphigoid. *Clin Immunol* 2008; 128(3): 415-26.
- Döpp R, Schmidt E, Chimanovitch I, Leverkus M, Bröcker E B, Zillikens D. IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in bullous

- Pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 577-583.
- Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; 8: 871-874.
- Eyre R W, Stanly J R. Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen. *J Clin Invest* 1988; 81: 807-812.
- Fry L. Dermatitis herpetiformis. *Bailliere's Clinical Gastroenterology* 1995; 9: 371-393.
- Gaucherand M, Nicolas J F, Paranhos Bacala G, Rouault J P, Reano A, Magaud J P, Thivolet J, Jolivet M, Schmitt D. Major antigenic epitopes of bullous pemphigoid 230 kDa antigen map within the C-terminal end of the protein. Evidence using a 55 kD recombinant protein. *Br J Dermatol* 1995; 132: 190-196.
- Georgi M, Jainta S, Bröcker E-B, Zillikens D. Autoantigene subepidermal Blasen bildender Autoimmundermatosen. *Der Hautarzt* 12, 2001.
- Giudice G J, Emery D J, Diaz L A. Cloning and primary structural analysis of the bullous Pemphigoid autoantigen BP180. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 243-250.
- Giudice G J, Emery D J, Zelickson B D, Anhalt G J, Liu Z, Diaz L A. Bullous Pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Immunol* 1993; 151: 5742-5750.
- Giudice G J, Wilske K C, Anhalt G J *et al.* Development of an ELISA to detect anti-BP180 autoantibodies in bullous pemphigoid and herpes gestationis. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 878-881.
- Graham F L, Smiley J, Russell W C, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36(1): 59-74.
- Green K J, Virata M L, Elgart G W, Stanley J R, Parry D A D. Comparative structural analysis of desmoplakin, BP antigen and plectin: members of a new gene family involved in organization of intermediate filaments. *Int J Biol Macromol* 1992; 14: 145-153.
- Green K J, Jones J C R. Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB J* 1996; 10: 871-881.
- Haase C, Budinger L, Borradori L *et al.* 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* 1998; 110: 282-286.
- Hamada T, Nagata Y, Tomita M, Salmhofer W, Hashimoto T. Bullous pemphigoid sera react specifically with various domains of BP230, most frequently with C-terminal domain, by immunoblot analysis using bacterial recombinant proteins covering the entire molecule. *Exp Dermatol* 2001; 10: 256-263.
- Hashimoto T, Ogawa M M, Konohana A, Nishikawa T. Detection of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antigens by immunoblot analysis using different antigen sources. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 327-331.
- Hashimoto T, Amagai M, Ebihara T *et al.* Further analysis of epitopes for human monoclonal anti-basement membrane zone antibodies produced by stable human hybridoma cell lines constructed with Epstein-Barr virus transformants. *J Invest Dermatol* 1993; 100: 310-315.
- Hashimoto T, Amagai M, Garrod D R, Nishikawa T. Immunofluorescence and immunoblot studies on the reactivity of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera with desmoglein 3 and desmoglein 1. *Epithelial Cell Biol* 1995; 4: 63-69.
- Hashimoto T. Skin diseases related to abnormality in desmosomes and hemidesmosomes – editorial review. *J Dermatol Sci* 1999; 20: 81-84.
- Hasler P, Zouali M. Immune receptor signaling, aging, and autoimmunity. *Cell Immunol* 2005; 233: 102-108.
- Hata Y, Fujii Y, Tsunoda K, Amagai M. Production of the entire extracellular domain of BP180 (type VII collagen) by baculovirus expression. *J Dermatol Sci* 2000; 23: 183-190.

- Herrero-Gonzalez J E, Sitaru C, Klinker E, Brocker E B, Zillikens D. Successful adjuvant treatment of severe bullous pemphigoid by tryptophan immuno-adsorption. *Clin Exp Dermatol* 2005; 30: 519-522.
- Herrero-Gonzalez J E, Brauns O, Egner R *et al.* Immunoabsorption against two distinct epitopes on human type XVII collagen abolishes dermal-epidermal separation induced in vitro by autoantibodies from pemphigoid gestationis patients. *Eur J Immunol* 2006; 36: 1039-1048.
- Higuchi R, Krummel B, Saiki R. A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(15): 7351-67.
- Hopkinson S B, Jones J C. The N-terminus of the transmembrane protein BP180 interacts with the N-terminal domain of BP230, thereby mediating keratin cytoskeleton anchorage to the cell surface at the site of the hemidesmosome. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 277-286.
- Ide A, Hashimoto T, Amagai M, Tanaka M, Nishikawa T. Detection of autoantibodies against bullous Pemphigoid and pemphigus antigens by an enzyme-linked immunosorbent assay using the bacterial recombinant proteins. *Exp Dermatol* 1995; 4: 112-116.
- Ino N, Kamata N, Matsuura C, Shinkai H, Okada M. Immunoabsorption for treatment of bullous pemphigoid. *Ther Apher* 1997; 1: 372-376.
- Jainta S, Zillikens D. Bullöse Autoimmundermatosen. *Schölmerich J: Konservative Therapie in Klinik und Praxis*. McGraw-Hill 2001.
- Jainta S, Schmidt E, Bröcker E B, Zillikens D. Diagnostik und Therapie bullöser Autoimmunerkrankungen der Haut. *Deutsches Ärzteblatt* 2001; 20: B 1123-1128.
- Jung M, Kippes W, Messer G, Zillikens D, Rzany B. Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence. *J Am Acad Dermatol* 1999; 41: 266-268.
- Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988; 16(20): 2299-2301.
- Kasperkiewicz M, Zillikens D, Rose C. Bullöse Autoimmundermatosen: Praktisches Vorgehen bei der Diagnostik. *Derm* 2007; 13: 352-361.
- Katz A, Minto J O, Toole J W, Medwidsky W. Immunopathologic study of herpes gestationis in mother and infant. *Arch Dermatol* 1997; 113: 1069-1072.
- Kippes W, Schmidt E, Roth A, Rzany B, Bröcker E B, Zillikens D. Immunopathologische Veränderungen bei 115 Patienten mit bullösem Pemphigoid. *Hautarzt* 1999; 50: 866-872.
- Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K *et al.* BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous Pemphigoid. *J Dermatol Sci* 2002; 30: 224-232.
- Koch P J, Walsh M J, Schmelz M, Goldschmidt M D, Zimbelmann R, Franke W W. Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of the cell adhesion receptors. *Eur J Cell Biol* 1990; 53: 1-12.
- Kromminga A, Sitaru C, Hagel C, Herzog S, Zillikens D. Development of an ELISA for the detection of Autoantibodies to BP230. *Clin Immunol* 2004; 111(1): 146-52.
- Labib R S, Anhalt G J, Patel H P, Mutasim D F, Diaz L A. Molecular heterogeneity of the bullous Pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. *J Immunol* 1986; 136: 1231-1235.
- Liu Z, Diaz L A, Troy J L *et al.* A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest* 1993; 92: 2480-2488.
- Lodish H, Berk A, Zipursky S L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J E. Molekulare Zellbiologie. *Spektrum*, 4. Auflage, 2001.
- Lottspeich F, Engels J W. Bioanalytik. *Spektrum*, 2. Auflage, 2006.

- Mariotti F, Grosso F, Terracina M *et al.* Development of a novel ELISA system for detection of anti-BP180 IgG and characterization of autoantibody profile in bullous pemphigoid patients. *Br J Dermatol* 2004; 151: 1004-1010.
- Masunaga T, Shimizu H, Yee C *et al.* The extracellular domain of BPAG2 localizes to anchoring filaments and its carboxyl terminus extends to the lamina densa of normal human epidermal basement membrane. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 200-206.
- Messer G, Schurren H, Meurer M. Herpes gestationis: immunologische und immunogenetische Aspekte. *Hautarzt* 1993; 44: 761-766.
- Morrison L H, Labib R S, Zone J J, Anhalt G J. Herpes gestationis antibodies recognize a 180-kDa human epidermal antigen. *J Clin Invest* 1988; 81: 2023-2026.
- Mueller S, Klaus-Kovtun V, Stanley J R. A 230-kD basic protein is the major bullous pemphigoid antigen. *J Invest Dermatol* 1989; 92: 33-38.
- Mullis K B. Eine Nachtfahrt in die Polymerasekettenreaktion. *Spektrum der Wissenschaft*, Heidelberg, 1990.
- Murakami H, Amagai M, Higashiyama M *et al.* Analysis of antigens recognized by usefulness of immunoblotting using a fusion protein representing an extracellular domain of the 180 kD bullous pemphigoid antigen. *J Dermatol Sci* 1996; 13: 112-117.
- Mutasim D F, Pelc N J, Anhalt G J. Cicatricial pemphigoid. *Dermatol Clin* 1993; 11: 499-510.
- Ogilvie P, Trautmann A, Dummer W, Rose C, Bröcker E B, Zillikens D. Pemphigoid gestationis ohne Blasenbildung. *Hautarzt* 2000; 51: 25-30.
- Ornstein L. Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann N Y Acad Sci* 1964; 121: 321-49.
- 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* 1999; 112: 141-147.
- Renart J, Reiser J, Stark G R. Transfer of Proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76(7): 3116-20.
- Reunala T, Blomqvist K, Tarpila S, Halme H, Kangas K. Gluten-free diet in dermatitis herpetiformis. I. Clinical response of skin lesions in 81 patients. *Br J Dermatol* 1977; 97: 473-480.
- Roenigk H H Jr, Ryan J G, Bergfeld W F. Epidermolysis bullosa acquisita. Report of three cases and review of all published cases. *Arch Dermatol* 1971; 103: 1-10.
- Ruhrberg C, Watt F. The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture. *Curr Opin Genet* 1997; 7: 392-397.
- Sawamura D, Li K, Chu M L, Uitto J. Human bullous pemphigoid antigen (BPAG1). Amino acid sequences deduced from cloned cDNAs predict biologically important peptide segments and protein domains. *J Biol Chem* 1991; 266: 17784-17790.
- Scaletta L J, Occhino J C, MacCallum D K *et al.* Isolation and immunologic identification of basement membrane zone antigens from human skin. *Lab Invest* 1978; 39: 1-9.
- Schmidt E, Reimer S, Kruse N *et al.* Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release IL-6 and IL-8 from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 842-846.
- Schmidt E, Obe K, Bröcker E B, Zillikens D. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 2000; 136: 174-178.
- Schmidt E, Zillikens D. Autoimmune and inherited subepidermal blistering diseases: advances in the clinic and the laboratory. *Adv Dermatol* 2000; 16: 113-157.
- Schmidt E, Zillikens D. Research in practice: diagnosis of subepidermal autoimmune bullous disorders. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009; 7(4): 296-300.

- Schumann H, Baetge J, Tasanen K, Wojnarowska F, Schäcke H, Zillikens D, Bruckner-Tudermann L. The shed ectodomain of collagen XVII/BP180 is targeted by autoantibodies in different blistering skin diseases. *Am J Pathol* 2000; 156: 685-695.
- Sitaru C, Schmidt E, Petermann S, Munteanu S L, Bröcker E B, Zillikens D. Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 664-671.
- Sitaru C, Powell J, Messer G, Bröcker E-B, Wojnarowska F, Zillikens D. Immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Pemphigoid gestationis. *Obstet Gynecol* 2004; 103: 757-763.
- Sitaru C, Dähnrich C, Probst C, Komorowski L, Blöcker I, Schmidt E, Schlumberger W, Rose C, Stöcker W, Zillikens D. Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16<sup>th</sup> non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies. *Exp Dermatol* 2007; 16: 770-777.
- Skaria M, Jaunin F, Hunziker T *et al.* IgG autoantibodies from bullous Pemphigoid patients recognize multiple antigenic reactive sites located predominantly within the B and C subdomains of the COOH-terminus of BP230. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 998-1004.
- Sonnenberg A, Nievers M, Schapveld, Geerts D, Niessen C, Borradori L. Interaction of BP180 and alpha6beta4. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 830-832.
- Stanley J R, Hawley-Nelson P, Yuspa S H, Shevach E M, Katz S I. Characterization of bullous pemphigoid antigen: A unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell* 1981; 24: 897-903.
- Stanley J R, Yaar M, Hawley-Nelson P, Katz S I. Pemphigus antibodies identify a cell glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes. *J Clin Invest* 1982; 70: 281-282.
- Stanley J R, Woodley D T, Katz S I. Identification and partial characterization of pemphigoid antigen extracted from normal human skin. *J Invest Dermatol* 1984; 82: 108-111.
- Stanley J R, Tanaka T, Mueller S, Klaus-Kovtun V, Roop D. Isolation of complementary DNA for bullous Pemphigoid antigen by use of patients' autoantibodies. *J Clin Invest* 1988; 82: 1864-1870.
- Stanley J R. Pemphigus and pemphigoid as paradigm of organ-specific, autoantibody-mediated diseases. *J Clin Invest* 1989; 83: 1443-1448.
- Sugi T, Hashimoto T, Hibi T, Nishikawa T. Production of human monoclonal anti-basement membrane zone (BMZ) antibodies from a patient with bullous Pemphigoid (BP) by Epstein-Barr virus transformation. Analysis of the heterogeneity of anti-BMZ antibodies in BP sera using them. *J Clin Invest* 1989; 84: 1050-1055.
- Tanaka T, Parry D A, Klaus-Kovtun V, Steinert P M, Stanley J R. Comparison of molecularly cloned bullous pemphigoid antigen to desmoplakin I confirms that they define a new family of cell adhesion junction plaque proteins. *J Biol Chem* 1991; 266: 12555-12559.
- Tanaka M, Hashimoto T, Amagai M *et al.* Characterization of BP antibodies by use of recombinant BP antigen proteins. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 725-728.
- Wever S, Burger M, Langfritz K *et al.* Herpes gestationis. Klinisches Spektrum und diagnostische Möglichkeiten. *Hautarzt* 1995; 46: 158-64.
- Wever S, Rank C, Hornschuh B, Hashimoto T, Nishikawa T, Bröcker E B, Zillikens D. Bullöses Pemphigoid unter dem Bild einer Prurigo simplex subacuta. *Hautarzt* 1995; 46: 789-795.
- Wojnarowska F, Marsden R A, Bhogal B, Black M M. Chronic bullous disease of childhood, childhood cicatricial pemphigoid, a linear IgA disease of adults. A comparative study demonstrating clinical and immunopathologic overlap. *J Am Acad Dermatol* 1988; 19: 792-805.

- Yamamoto K, Inoue N, Masuda R *et al.* Cloning of hamster type XVII collagen cDNA, and pathogenesis of anti-type XVII collagen antibody and complement in hamster bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 485-492.
- Yancey K B. Adhesion molecules. II: Interactions of keratinocytes with epidermal basement membrane. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 1008-1014.
- Yang Y, Dowling J, Yu Q C, Kouklis P, Cleveland D W, Fuchs E. An essential linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell* 1996; 86: 655-665.
- Yoshida M, Hamada T, Amagai M, Hashimoto K, Uehara R, Yamaguchi K, Imamura K, Okamoto E, Yasumoto S, Hashimoto T. Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 2006; 41: 21-30.
- Zillikens D, Wever S, Roth A, Weidenthaler-Barth B, Hashimoto T, Bröcker E B. Incidence of autoimmune subepidermal blistering diseases in a region of central Germany. *Arch Dermatol* 1995; 131: 957-958.
- Zillikens D, Giudice G J, Diaz L A. Bullous pemphigoid. An autoimmune blistering disease of the elderly. *J Geriatr Dermatol* 1996; 4: 35-41.
- Zillikens D, Diaz L A. Autoimmune bullous diseases. Burg G, Dummer R: Strategies for immunointervention in dermatology. *Springer* 1997: 217-226.
- Zillikens D. Acquired skin disease of hemidesmosomes. *J Dermatol Sci* 1999; 20: 134-154.
- Zillikens D, Herzele K, Georgi M *et al.* Autoantibodies in a subgroup of patients with linear IgA disease react with the NC16A domain of BP180. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 947-953.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

°C - Grad Celsius, aa - Aminosäure, A. dest. - Aqua destillata, Ak - Antikörper, AAK - Autoantikörper, AP - alkalische Phosphatase, AUC - „Area Under the Curve“, BP - bullöses Pemphigoid, BSA - Rinderserum Albumin, cDNA - „copy“ Desoxyribonukleinsäure, DEJ - dermo-epidermale Junktionszone, DIF - direkte Immunfluoreszenz, DNA - Desoxyribonukleinsäure, dNTP - Desoxyribonukleosidtriphosphat, Dsc - Desmocollin, Dsg - Desmoglein, DTT - Dithiothreitol, EDTA - Ethylendiamintetraessigsäure, ELISA - „enzyme-linked immunosorbent assay“, EP - Euroimmun Primer, FITC - Fluoresceinisothiocyanat, FKS - fötales Kälberserum, gebr. - gebrauchsfertig, h - Stunde, HEK - Human Embryonic Kidney (humane embryonale Nierenepithelzelle), hu - human, Ig - Immunglobulin, IIF - indirekte Immunfluoreszenz, IFT - indirekter Immunfluoreszenz Test, kb - Kilobasen, kD - Kilodalton, LAD - Lineare IgA Dermatose, LB-Medium - Luria-Bertani-Medium, mA - Milliampere, ml - Milliliter, mM - millimolar, mo. - monoklonal, mRNA - „messenger RNA“, n - Probenanzahl, ng - Nanogramm, OFR - offener Leserahmen, PBS - „phosphate buffered saline“, PCR - Polymerasekettenreaktion, PG - Pemphigoid gestationis, PF - Pemphigus foliaceus, POD - Peroxydase, PV - Pemphigus vulgaris, RNA - Ribonukleinsäure, ROC - „Receiver Operating Characteristic“, rpm - „rounds per minute“ (Umdrehungsfrequenz), RT - reverse Transkriptase, TAE - Tris-Acetat-EDTA-Puffer, U - Unit, v/v - „volume/volume“, WB - Westernblot, w/v - „weight/volume“, well - Gefäß einer Kulturplatte, µl - Mikroliter, µM - mikromolar

## 8 Danksagung

Ich danke vor allem Dr. med. Winfried Stöcker für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit bei der EUROIMMUN AG durchführen zu dürfen und für die Betreuung.

Prof. Dr. med. Jürgen Westermann und Prof. Dr. med. Detlef Zillikens danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die nette Zusammenarbeit, konstruktive Kritik und die Bereitstellung der Seren.

Prof. Dr. rer. nat. Norbert Tautz und Prof. Dr. rer. nat. Thomas Peters danke ich für die Bewertung meiner Arbeit als Berichterstatter bzw. Prüfungsvorsitzender.

Dr. rer. nat. Christian Probst und Dr. rer. nat. Lars Komorowski spreche ich meinen Dank für die hervorragende Betreuung und Unterstützung aus, und dass ich jeder Zeit mit allen Belangen zu ihnen kommen konnte.

Aus der Abteilung Molekularbiologie danke ich vor allem Frau Beatrice Schneider, Frau Susann Günther, Frau Doreen Weigel und Frau Britta Auweck für die Hilfe bei den molekularbiologischen Fragestellungen.

Für die Hilfe bei der Aufreinigung der Proteine bin ich dem Institut für immunobiochemische Forschung dankbar.

Der Abteilung Blot-Techniken danke ich für die nette Unterstützung und eine tolle Zeit.

Bei der Abteilung Autoantikörper-ELISA, insbesondere Frau Cornelia Dähnrich, bedanke ich mich für die Hilfe bei der Entwicklung des Anti-BP230-C3-ELISA-Testsystems.

Meiner Mutter, die mir das ermöglicht hat.