

**Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Zillikens**

---

**Entwicklung eines ELISA zum Nachweis zirkulierender Antikörper gegen  
Kollagen Typ VII im aktiven Mausmodell der Epidermolysis bullosa acquisita**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -  
vorgelegt von  
Thorben Wilhelm Fründt  
aus Hildesheim  
Lübeck 2010

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr.med. Dr. rer. nat. Enno Schmidt

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2010

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 22.11.2010

## Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
Phänotypen der EBA	1
Epidemiologie	3
Molekularer Aufbau der Haut	3
Identifizierung des Antigens der EBA	5
Pathogenese	7
Tiermodelle der EBA	8
<b>Fragestellung</b>	<b>10</b>
<b>Material und Methoden</b>	<b>11</b>
Design der PCR-Primer zur Amplifizierung der mCol VIIc-DNA	11
Amplifizierung der mCol VIIc-DNA mittels PCR	11
Agarosegelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten	12
Aufreinigung des Vektor-Plasmid aus <i>E.coli</i> -Bakterien	13
Restriktionsverdau der DNA-Fragmente und des Vektors	15
Herstellung chemisch kompetenter Zellen	15
Ligation von DNA und pTwin1-Vektor	16
Transformation	16
Identifikation rekombinanter Klone mittels Kolonie-PCR	17
Kontrollverdau rekombinanter Klone	18
Sequenzanalyse isolierter Bakterienplasmide	18
SDS-Page	19
Proteintransfer aus SDS-Gelen auf Nitrocelulosemembranen	21
Immundetektierung von Fusionsproteinen	21
Proteinexpression des Intein-Fusionsprotein mCol VIIc	22
Affinitätsaufreinigung des mCol VIIc-Protein	23
Proteinaufreinigung mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie	23
Bestimmung der Proteinkonzentration	25
Optimierung der Bedingungen des mCol-VIIc ELISA	25
Immunisierung von Mäusen mit GST-mCol VIIc-Protein	26
Detektierung von Antikörpern in Mäuseseren mittels ELISA	26
Statistik	27
<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
Amplifizierung der mCol VIIc-DNA mittels PCR	29

Herstellung rekombinanter Plasmide	29
Untersuchung auf Vektor tragende Bakterien mittels Kolonie-PCR	30
Restriktionsverdau rekombinanter pTwin1-mCol VIIc-Vektoren	30
SDS-Analyse und Immundetektierung von Fusionsproteinen	31
Sequenzierung rekombinanter Klone	32
Proteinexpression und Affinitätsaufreinigung des mCol VIIc-Proteins	34
Immunoblot mit Seren erkrankter Mäuse	35
Analyse der Anionenaustauschchromatographie	36
Optimierung der mCol VIIc-ELISA Parameter	38
Messungen von Mäuseseren mittels mCol VIIc- und GST-mColVIIc ELISA	39
Korrelation von klinischem Erscheinungsbild und zirkulierenden Antikörpern	41
Bestimmung der Korrelation in verschiedenen Mäusestämmen	43
<b>Diskussion</b>	<b>45</b>
Etablierung von Tiermodellen der EBA	45
Konstruktion und Aufreinigung eines nicht-modifizierten C-Fragmentes der NC1 Domäne von Kollagen Typ VII	46
Das nicht modifizierte C-Fragment detektiert Anti-Kollagen Typ VII Antikörper	46
Die Verwendung eines nicht modifizierten Antigens vereinfacht Messungen im ELISA	47
Die Aussagekraft des neuen mCol VIIc-ELISA unterscheidet sich nicht signifikant vom GST-mCol VIIc-ELISA	48
Das Ausmaß der Hautläsionen in immunisierten Mäusen ist abhängig vom jeweiligen Stamm	49
Ausblick	50
<b>Schlussfolgerung</b>	<b>51</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>52</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>53</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>62</b>
<b>Publikation</b>	<b>64</b>
<b>Danksagung</b>	<b>65</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>66</b>

## Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammonium Persulfat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
DAB	Diaminobenzidin
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Êthylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase ,engl. <i>horseradish peroxidase</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Kaliummonohydrogenphosphat <i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
mA	Milliamper
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mM	Millimolar
mV	Millivolt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
Nm	Nanometer
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion,engl. <i>Polymerase Chain Reaktion</i>
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
μl	Mikroliter

## **Einleitung**

Die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) ist eine erworbene Blasen bildende Autoimmunerkrankung der Haut und der Schleimhäute, die durch zirkulierende und subepidermal gebundene Autoantikörper charakterisiert ist. Die Autoantikörper richten sich gegen Kollagen Typ VII, den Hauptbestandteil der Verankerungsfibrillen zwischen Epidermis und Dermis in der dermo-epidermalen Junctionszone der Haut (39, 59).

Die erste Blasen bildende Erkrankung der Haut, die an das Krankheitsbild der EBA erinnert, wurde 1895 durch Elliott beschrieben. In den folgenden Jahren wurden wenige weitere Fälle dieser Krankheit dokumentiert (2, 76, 78, 81). 1970 wurden schließlich zum ersten Mal diagnostische Kriterien für die EBA festgelegt. Zu diesen Kriterien zählen (1.) das Auftreten von spontanen oder traumatisch induzierbaren Blasen, die an das Erscheinungsbild der hereditären, dystrophischen Epidermolysis bullosa erinnern; (2.) der Beginn der Erkrankung im Erwachsenenalter; die negative Familienanamnese für dystrophische Epidermolysis bullosa und (4.) der Ausschluss aller anderen bullösen Erkrankungen der Haut (81).

## **Phänotypen der EBA**

Das klinische Erscheinungsbild der EBA weist verschiedene Phänotypen auf. Patienten können an einer entzündlichen oder nicht-entzündlichen Form dieser Krankheit leiden. Die nicht-entzündliche, mechanobullöse Form der EBA imponiert mit traumatisch induzierbaren straffen Blasen und Erosionen der Haut. Die Blasen können an jeder Haut- oder Schleimhautoberfläche entstehen, bilden sich charakteristischer Weise aber in mechanisch beanspruchten Arealen wie z.B. den Streckseiten der Extremitäten, den Zehen und an den Rückseiten der Hände. Die Läsionen heilen unter der Bildung von Narben und Milien ab. Die Haut der Patienten ist oft sehr brüchig. Außerdem kommt es gehäuft zu Wachstumsstörungen der Fuß- und Fingernägel, sowie Hyper- oder Hypopigmentierung der betroffenen Haut nach Abheilung der Erkrankung (81). Da die Krankheit sowohl Haut als auch Schleimhäute betreffen kann, ist das Auftreten von persistierender Zahnfleischentzündungen im Verlauf der Erkrankung möglich (38).

Bei der entzündlichen Form der EBA kommt es zu einer ausgeprägten Blasenbildung und entzündlichen Infiltrationen der Haut an Stamm und Extremitäten, die gewöhnlich von Juckreiz begleitet sind (Abb.1). Im Gegensatz zur mechanobullösen Form ist jedoch die Brüchigkeit der Haut weniger ausgeprägt und die Formierung von Narben oder Millien ist reduziert oder fehlt ganz (39). Dieses klinische Erscheinungsbild ähnelt anderen bullösen Autoimmundermatosen, so z.B. dem des bullösen Pemphigoid, dem Schleimhautpemphigoid und der linearen IgA-Dermatose (23, 30, 54).



**Abb.1. Entzündliche Variante der Epidermolysis bullosa acquisita.**

Es kommt zur Bildung von straffen, subepidermalen Blasen und Erosionen, die unter Narbenbildung abheilen. Nach Abheilung ist eine Hypo- oder Hyperpigmentierung der betroffenen Haut sichtbar.

*Quelle: Schmidt et al., 2006.*

So kommt es z.B. im Verlauf der dem bullösen Pemphigoid ähnelnden Form der entzündlichen EBA zur Bildung von straffen Blasen auf großflächig entzündeten Hautarealen (30). Allerdings können die entzündeten Hautareale, die an den Extremitäten und am Körperstamm lokalisiert sind, auch ohne Blasenbildung vorliegen. Parallel zu der Entzündung tritt gewöhnlich ein Juckreiz auf.

Bei einer weiteren Verlaufsform, die dem Schleimhautpemphigoid ähnlich ist, kommt es zur Entstehung von Erosionen und Narben vor allem an den Schleimhäuten. Hier können die Konjunktiven, die Mundschleimhaut sowie der obere Ösophagus und der Anus befallen sein. Als schwerwiegende Komplikation des Krankheitsverlaufes dieser Variante der EBA ist eine Stenose der Speiseröhre

beschrieben (23, 41, 99). Patienten, die initial an der entzündlichen Form der EBA erkrankten, können im Verlauf der Erkrankung oder überlappend eine mechanobullöse Form entwickeln (99).

Obwohl die EBA gemäß den ursprünglich festgelegten Diagnosekriterien eine Krankheit des Erwachsenenalters ist, sind mehrerer Fälle von Erkrankungen im Kindesalter beschrieben (20, 84, 101). Bei erkrankten Kindern kommt es häufig zur Beteiligung der Schleimhäute. Die Prognose der Erkrankung bei Beginn im Kindesalter ist jedoch günstiger im Vergleich zu einer Manifestation im Erwachsenenalter (13).

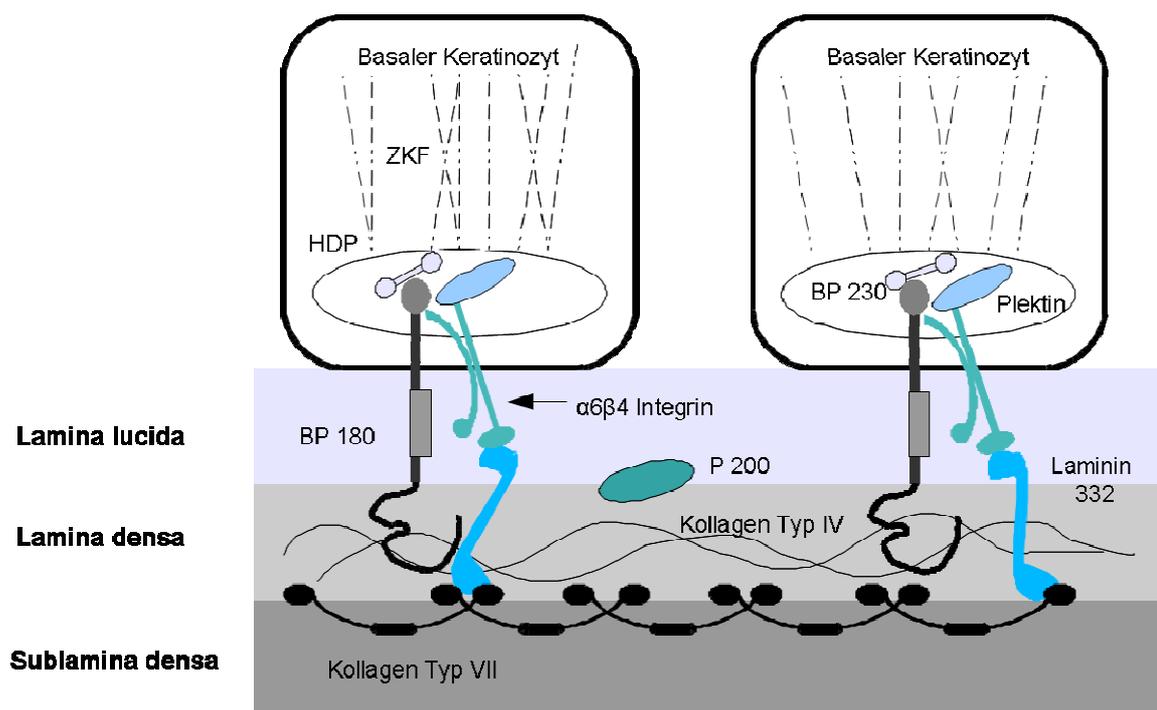
## **Epidemiologie**

Die EBA mit ihren verschiedenen Verlaufsformen ist eine seltene Erkrankung, wobei insgesamt das Erscheinungsbild der mechanobullösen, nicht entzündlichen Form die Mehrzahl aller Fälle ausmacht (59). Lediglich fünf Prozent der Patienten, die zirkulierende Antikörper gegen Strukturen der Basalmembran der Haut aufweisen, sind an der EBA erkrankt (112). Die weltweite Inzidenz variiert: für Frankreich wird sie mit 0,17 -0,26, für Kuwait mit 0,23, und für Singapur mit 0,26 Neuerkrankungen pro Millionen Einwohner und Jahr angegeben (4, 73, 105). Für eine Region im Süden Deutschlands konnte in einer jüngeren Studie eine Inzidenz von 0,5 ermittelt werden (5). Eine geschlechtsspezifische Häufung oder ein erhöhtes Vorkommen in verschiedenen ethnischen Gruppen scheint nicht zu bestehen, allerdings ist ein gehäuftes Vorkommen der EBA bei Trägern des Haplotyps DR2 des humanen Leukozyten Antigens (HLA) beschrieben (28, 31).

## **Molekularer Aufbau der Haut**

Die dermo-epidermale Junctionszone (DEJ), die sich ultrastrukturell weiter in die Schichten Lamina lucida, Lamina densa und Sublamina densa unterteilen lässt, bildet ein straffes Netzwerk aus verschiedenen, miteinander vernetzten Strukturproteinen (Abb.2). Dieses Netzwerk, das das Zytoskelett der basalen Keratinozyten der Epidermis mit den Ankerfibrillen der papillären Dermis verbindet, hat eine wichtige Funktion für die Stabilität und die Struktur der Haut (9). Das Zytoskelett

der basalen Keratinozyten der Epidermis wird durch Keratinfilamente stabilisiert. Die Filamente bilden intrazellulär ein dreidimensionales Netzwerk, das sowohl am Zellkern der Keratinozyten als auch an den desmosomalen und hemidesmosomalen Plaques der Zellmembran inseriert. Während die desmosomalen Plaques eine feste Verankerung zwischen benachbarten Keratinozyten ermöglichen, sind die hemidesmosomalen Plaques am dermalen Pol der basalen Keratinozyten wichtig für die Verankerung mit der DEJ. Intrazelluläre Bestandteile der hemidesmosomalen Plaques sind die Proteine Plektin und BP 230. Diese sind mit den intrazellulären Anteilen der transmembranösen Proteine BP180 und  $\alpha 6\beta 4$ -Integrin verbunden. Die extrazellulär gelegenen Anteile von BP180 und  $\alpha 6\beta 4$ -Integrin vermitteln zusammen mit dem ebenfalls extrazellulär gelegenen Laminin 332 (früher auch als Eplegrin und Laminin 5 bezeichnet) den Kontakt zu den in der Lamina densa und Sublamina densa verlaufenden Verankerungsfibrillen (16). Die Verankerungsfibrillen setzen sich hauptsächlich aus Kollagen Typ VII zusammen (83).



**Abb. 2. Schematische Darstellung der dermo-epidermalen Junctionszone mit wichtigen Zielantigenen bullöser Autoimmundermatosen.**

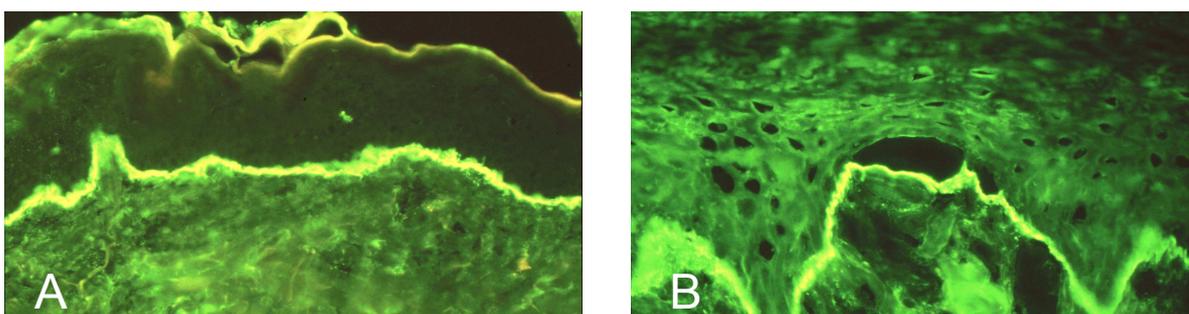
BP230 und Plektin sind Proteine der hemidesmosomalen Plaques. Plektin interagiert mit  $\alpha 6\beta 4$  Integrin, welches wiederum mit Laminin 332 interagiert. Laminin 332 ist über fibronektinartige Bereiche mit Kollagen Typ VII in der Lamina densa und Sublamina densa verbunden. ZKF = Zytokeratinfilamente, HDP = hemidesmosomale Plaques.

(Abb. adaptiert nach Sitaru et al., 2005)

Verschiedene Strukturproteine, die in der DEJ und in den basalen Keratinozyten vorkommen, konnten in den vergangenen Jahren als Antigene bei Blasen bildenden Autoimmunerkrankungen der Haut identifiziert werden. Für das bullöse Pemphigoid wurden die Proteine BP230 (97) und BP180 (25) als Antigene ermittelt, die von Autoantikörpern erkannt werden. Untereinheiten von Laminin 332 (1, 26, 52, 74, 75) und  $\alpha 6\beta 4$ - Integrin (6, 53), sowie BP180 (62, 63, 96) sind als Zielantigene des Schleimhautpemphigoid beschrieben. Bei weiteren Blasen bildenden Erkrankungen der Haut spielen ein 200 kDa-schweres in der DEJ lokalisiertes Protein (p200) (113) sowie Untereinheiten des Kollagen Typ IV (34, 35) als Antigen eine Rolle.

### Identifizierung des Antigens der EBA

Bei Patienten mit EBA lassen sich mit Hilfe der direkten Immunfluoreszenzmikroskopie in Probenbiopsien periläsionärer Haut Ablagerungen von Immunglobulinen (IgG) und C3 entlang der DEJ nachweisen (Abb.3). Die Autoantikörper aus Seren von EBA-Patienten binden in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie an die dermale Seite von NaCl-separierter menschlicher Spalthaut und verdeutlichen, dass das Antigen, gegen welches die Autoantikörper gerichtet sind, in diesem Bereich der DEJ lokalisiert ist (29).



**Abb. 3. Nachweis von IgG- und Komplementablagerungen entlang der dermo-epidermalen Junctionszone.** Die Probenbiopsien aus periläsionaler Haut eines Patienten mit EBA wurden mittels direkter Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht (**A**). Es zeigten sich lineare Ablagerungen von IgG an der dermo-epidermalen Junctionszone (DEJ), die mittels eines fluoreszierenden Sekundärantikörpers als hell leuchtende Bande sichtbar gemacht wurden. Die Serumautoantikörper dieses Patienten banden am Boden der künstlichen Spalte in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie auf humaner Spalthaut (**B**).  
Quelle: Schmidt et al., 2006.

1981 konnte durch Einsatz der Immunelektronenmikroskopie bei EBA-Patienten eine Ablagerung von IgG in der Sublamina densa der DEJ nachgewiesen werden (111). Schließlich wurde 1984 ein 290 kDa schweres Protein aus der menschlichen DEJ als Zielantigen der EBA bestimmt, welches als Kollagen Typ VII identifiziert wurde (106, 107). Diese Ergebnisse konnten 1985 bestätigt werden, als man entdeckte, dass Kollagen Typ VII, welches man aus Extrakten humaner Keratinozyten und Fibroblasten gewonnen hatte, von Autoantikörpern der Seren von EBA-Patienten erkannt und präzipitiert wurde (98).

Kollagen Typ VII, ein antiparalleles Dimer-Molekül, ist der Hauptbestandteil der in der Lamina densa und Sublamina densa lokalisierten Verankerungsfibrillen (3, 67, 71, 83) (Abb.2). Jedes Kollagen Typ VII Monomer besteht aus drei identischen  $\alpha$ -Ketten, die wiederum aus Vorstufen entstehen. Die Vorstufen werden als Ketten, so genannte pro  $\alpha$ -Kette, von Keratinozyten und Fibroblasten synthetisiert und in den Extrazellularraum sezerniert. Jede pro  $\alpha$ 1-Vorstufe ist etwa 300 kDa schwer und besteht aus einer 145 kDa schweren, zentralen kollagenen Trippe-Helix. Diese Tripel-Helix ist an ihrem aminoterminalen Ende mit einer 145 kDa schweren nicht-kollagenen Domäne (NC1-Domäne) und an ihrem carboxyterminalen Ende mit einer 34 kDa schweren nicht-kollagenen Domäne (NC2-Domäne) verbunden (77). Die Vorstufen, die in den Extrazellularraum sezerniert werden, lagern sich nach Abspaltung eines kleinen Fragmentes von der NC2-Domäne an den carboxyterminalen Enden aneinander und bilden antiparallele End-zu-End-Dimere (15). Diese Dimere werden durch Disulfidbrücken stabilisiert und aggregieren später zu Ankerfibrillen, die anschließend mit Laminin 332 und Kollagen Typ IV interagieren (50).

Die wichtige biologische Funktion des Kollagen Typ VII für die Integrität und Stabilität der Haut wird durch das Krankheitsbild der Epidermolysis bullosa dystrophica belegt: Durch Mutationen im COL7A1-Gen, das für das Kollagen Typ VII codiert, kann es zu Fehlern in der Synthese, Sekretion oder in der molekularen Anordnung des Kollagen Typ VII kommen (10-12, 19, 60). Die Epidermolysis bullosa dystrophica ist eine klinisch heterogene Erkrankung mit unterschiedlich ausgeprägtem Erscheinungsbild und kann Blasenbildung, Brüchigkeit der Haut sowie Juckreiz hervorrufen (27, 66).

Kollagen Typ VII findet sich nicht nur in der Lamina densa und Sublamina densa der menschlichen Haut, sondern konnte auch in der Verbindungszone zwischen

der Lamina epithelialis und der Lamina propria im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden (17).

Autoantikörper aus den Seren von Patienten, die an EBA erkrankt sind, erkennen hauptsächlich Bereiche, die in der NC1-Domäne des Kollagen Typ VII liegen (33, 57). Allerdings kann es auch zur Bindung von Antikörpern an Bereiche kommen, die auf der NC2-Domäne oder der zentralen kollagenen Helix lokalisiert sind (32, 46, 47, 57, 84, 100).

## **Pathogenese**

Die Mechanismen, die zur Entstehung der EBA beitragen, und auslösende Ursachen sind zurzeit noch unbekannt. Ein Ausbruch der EBA nach einer antibiotischen Therapie ist beschrieben (24). Auf Grund modifizierter Kriterien, die ursprünglich von Witebsky et al. postuliert wurden, kann die EBA eindeutig als eine Autoimmunerkrankung klassifiziert werden (39, 95, 104). Zu diesen Kriterien zählen: (1) Hinweise durch klinische Beobachtungen, z.B. Ablagerungen von Immunglobulinen in betroffenen Organen; (2) Reproduzierbarkeit der Krankheit im Tiermodell, entweder durch den passiven Transfer von autoreaktiven T-Zellen oder Immunglobulinen oder (3) Induktion der Krankheit in Tieren durch Immunisierung mit dem Autoantigen (82).

Die pathogenetische Relevanz der Autoantikörper gegen Kollagen Typ VII konnte erstmals in einem *ex-vivo* Model demonstriert werden: Bei dieser Untersuchung, bei der Antikörper gegen Typ VII Kollagen mit Gefrierschnitten menschlicher Haut und Leukozyten gesunder Spender inkubiert wurden, konnte eine subepidermale Spaltbildung und die Aktivierung von Leukozyten induziert werden (42, 92).

Auch bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa finden sich Autoantikörper gegen Kollagen Typ VII (17). In manchen Studien leiden bis zu 30% der EBA-Patienten zusätzlich an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, wobei eine erfolgreiche Behandlung dieser Erkrankung keinen erkennbaren Effekt auf die Aktivität und den Verlauf der EBA hatte (43, 55, 80). Die Relevanz des gleichzeitigen Auftretens von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und der EBA ist noch unklar (45). Autoantikörper gegen Kollagen Typ VII werden außerdem auch bei Patienten mit bullösem systemischen Lupus erythematodes nachgewiesen (31).

## **Tiermodelle der EBA**

Um die Krankheitsmechanismen und Pathogenitätsfaktoren der EBA weiter zu untersuchen, wurden verschiedenen Tiermodelle etabliert. In einem als passives Tiermodell bezeichnetem Mausmodell wurde durch den Transfer von Anti-Kollagen-Typ VII Antikörpern aus immunisierten Kaninchen in Mäusen eine subepidermale Blasenbildung induziert (93). Die erkrankten Tiere zeigten klinisch, histologisch und immunpathologisch alle Merkmale der EBA. Andere Versuche, durch Injektion von humanen Autoantikörpern von EBA-Patienten in neonatalen Mäusen eine Blasenbildung zu induzieren und somit ein Tiermodell der EBA zu etablieren, waren zuvor gescheitert (87). Zwar konnten die humanen Antikörper gegen Kollagen Typ VII nach der Injektion in der DEJ der Mäuse nachgewiesen werden, die Bildung von Blasen wurde jedoch nicht beobachtet (8). Als Ursache für die Probleme bei der Etablierung des Modells wurde eine niedrige Homologie zwischen humanem und murinem Typ VII Kollagen und eine zu kurze Interaktionszeit zwischen dem Antigen und den injizierten Antikörpern aus den Seren der Patienten gesehen (87).

2006 wurde ein Mausmodell entwickelt, welches auf einer aktiven Immunisierung mit einem rekombinanten Fragment des Kollagen Typ VII beruht. Die Tiere in diesem Modell, das auch als aktives Mausmodell bezeichnet wird, wiesen zirkulierende Antikörper gegen Kollagen Typ VII auf und zeigten in der direkten Immunfluoreszenzmikroskopie deutliche Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplementfaktoren in der DEJ (90).

Im Folgenden wurden die Pathomechanismen in diesen Modellen weiter charakterisiert. Die Bedeutung des Komplementsystems wurde dadurch unterstrichen, dass in erkrankten Mäusen im Tiermodell nach Immunisierung mit einem rekombinanten Kollagen Typ VII überwiegend komplementfixierende Antikörper der Subklassen 2a und 2b entstehen (90, 94). Komplement-defiziente Mäuse, denen Antikörper gegen Typ VII Kollagen injiziert werden, sind resistent gegen die Induktion von Blasen (69, 93, 108). Durch die Modifizierung von Antikörpern konnte gezeigt werden, dass die isolierten  $F(ab')_2$  Fragmente der Antikörper ihr blasenbildendes Potenzial verlieren. Durch gebundene Antikörper aktivierte Leukozyten spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entstehung von subepidermalen Blasen. Ex-

perimentell konnte durch Hemmung der leukozytären Enzyme Elastase und Gelatinase B sowie der NADPH-Oxidase die Antikörper vermittelte Blaseninduktion unterdrückt werden (18, 88).

Um den Verlauf der Erkrankung und die Aktivität der Krankheit in den immunisierten Tieren des aktiven EBA Modells messen und beurteilen zu können, werden verschiedenen Methoden verwendet. Das Ausmaß der klinischen Erkrankung wird mit Hilfe eines Score-Systems erfasst, bei dem der Anteil der betroffenen Körperoberfläche der Mäuse berücksichtigt wird (90, 93). Die subepidermale Blasenbildung kann in Gewebsschnitten erkrankter Haut histologisch dargestellt werden. Für die Darstellung der Ablagerungen von Immunglobulinen entlang der DEJ eignet sich die direkte Immunfluoreszenzmikroskopie (DIF). Um im Serum zirkulierende Antikörper gegen Kollagen Typ VII zu messen, wird ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) verwendet, bei dem ein Fragment der NC1-Domäne des Kollagen Typ VII als Antigen eingesetzt wird, das an eine Gluthathion-S-Transferase (GST) gekoppelt vorliegt.

### **Fragestellung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen ELISA zu entwickeln, mit dem im aktiven Mausmodell der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) zirkulierende Antikörper gegen die NC-1 Domäne des murinen Kollagen Typ VII detektiert werden können.

Zu diesem Zweck sollte das Fragment von Kollagen Typ VII, welches für das aktive Mausmodell als Gluthathion-S-Transferase (GST) gekoppeltes Protein verwendet wurde, ohne einen solchen Anhang exprimiert werden (90). Auf diese Weise sollte verhindert werden, dass neben den pathogenetisch bedeutenden anti-Kollagen-Antikörpern auch störende anti-GST-Antikörper bei Messungen im ELISA an das Protein binden.

Für die Herstellung dieses Fragmentes, das aus 210 Aminosäuren besteht (Aminosäure 757 – 967 der NC1-Domäne, auch als mCol VIIc bezeichnet (93)), wurde ein Proteinexpressionssystem in Bakterienzellen gewählt, das die Aufreinigung von nicht modifizierten Proteinen ermöglicht. Nach der Klonierung von Bakterien und der Gewinnung des Proteins sollte ein ELISA entwickelt werden, mit dem Antikörper gegen das murine Kollagen Typ VII detektiert werden können.

Dieser neu entwickelte ELISA sollte Vorteile hinsichtlich seiner Durchführbarkeit und seiner Aussagekraft gegenüber dem bereits etablierten ELISA unter Verwendung der GST-gekoppelten NC1-Domäne von Typ VII Kollagen haben.

## Material und Methoden

### Design der PCR-Primer zur Amplifizierung der mCol VIIc-DNA

Die Primer (*MWG-Biotech AG, Ebersberg*) zur Amplifikation des mCol VIIc-Fragmentes wurden anhand von Sequenzierungsdaten für murines Kollagen Typ VII, die aus der *GenBank* DNS Datenbank (Cambridge, UK) entnommen wurden, erstellt. Für die Klonierung enthielten die Primer neben einer Annealing-Sequenz für die Vervielfältigung (*Amplifizierung*) des C-Fragmentes auch Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen BamH I und Nco I (Tab.1). Die Primer wurden als Stammlösung mit einer Konzentration von 100 pmol/ µl bei -80°C gelagert.

Länge	Primer Sequenz ( 5´-3´)
33-mer	FP-mcol7int1: GGTGGT <u>CCATGG</u> CAGTAGCTGGTGTGGATGGAG  Nco I
33-mer	RP-mcol7int1: GGTGGT <u>GGATCC</u> TTAGTCCACCACGCGTAGTTC  BamH I  Stop-Codon

**Tab. 1. Nukleotidsequenz des Vorwärtsprimer (FP) und des Rückwärtsprimer (RP).** Die Sequenzen, die von den Restriktionsendonukleasen Nco I und BamH I erkannt werden, und das *Stop-Codon*, sind hervorgehoben.

### Amplifizierung der mCol VIIc-DNA mittels PCR

Zur Amplifizierung der DNA-Sequenz mittels PCR wurde ein pGEX-mCol VIIc - Vektor als Vorlage (*Template*) verwendet, in dem die DNA-Sequenz des C-Fragmentes integriert vorlag. Dieser Vektor war im Zuge vorheriger Arbeiten hergestellt worden (93). Für jede PCR-Reaktion wurde folgender Reaktionsansatz vorbereitet:

5x GoTaq Flexi Buffer  
(*Promega Corporation, Madison, USA*) 10 µl

25 mM MgCl <sub>2</sub> -Lösung ( <i>Promega</i> )	4 µl
10 mM dNTP-Mix ( <i>Promega</i> )	1 µl
FP-Primer und RP-Primer	je 2 µl ( 10 pmol/µl )
Template: pGEX-mCol7c ( 10 ng/µl )	1 µl
GoTaq ® DNA Polymerase ( <i>Promega</i> )	0.25 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Für die Durchführung der PCR wurde eine GeneAmp PCR System 9700 Maschine verwendet (*Applied Biosystems, Foster City, USA*). Zu Beginn der PCR wurde die DNA zur Denaturierung für 3 min auf 94 °C erhitzt. Ein PCR-Zyklus bestand aus 10 sec. bei 94 °C zur Denaturierung, gefolgt von 20 sec. bei 62°C als Annealing-Phase, in der sich die Primer an die DNA-Einzelstränge anlagern, und 40 sec. bei 72°C zur Elongation der DNA-Fragmente. Insgesamt wurden 35 PCR-Zyklen durchlaufen, wobei nach dem letzten Zyklus eine fünfminütige Phase bei 72°C zur Kettenverlängerung folgte. Jeder PCR-Reaktionsansatz wurde aufgereinigt (*High Pure PCR Purification Kit, Roche, Basel, Schweiz*) und in 50 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

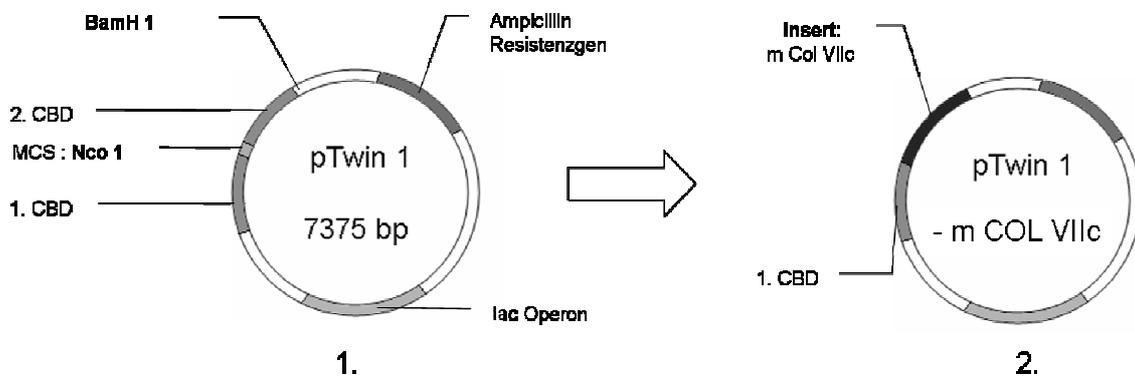
#### **Agarosegelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten**

Für die Kontrolle der einzelnen PCR-Ansätze wurden je 5 µl pro Ansatz auf ein Gel aus 1,5 % Agarose (*NEEO Ultra Qualität Agarose, Carl Roth GmbH, Karlsruhe*) geladen. Dem Gel wurde vor dem Gießen GelStar® Nucleic Acid Gel Stain (*lonza, Basel, Schweiz*), 1:10.000 verdünnt, beigemischt, um später die replizierten DNA-Fragmente im UV-Licht sichtbar machen zu können. An das Gel wurde in einer Elektrophoresekammer (*Mini SUB Cell GT, Bio Rad, München*) für eine Stunde eine Spannung von 90 Volt angelegt. Anschließend wurde das Agarose-Gel zur Analyse auf eine UV-Bank (*UV-Transilluminator TFX-20 M BRL, Life Technologies, Karlsruhe*) gelegt und im abgedunkelten Raum unter UV-Licht betrachtet. Alle Ansätze, in denen die DNA-Sequenz des C-Fragmentes mit einer Größe von 630 Basenpaaren (bp) amplifiziert werden konnte, wurden mit einem 6-fachen Gel-loading Buffer gemischt und erneut auf ein 1,5%iges Agarose-Gel geladen. Nach einstündiger elektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel wieder auf einer UV-Bank betrachtet und die entsprechenden Banden mit Hilfe eines sterilen Einmal-Skalpells aus dem Gel herausgeschnitten. Die DNA-Fragmente wurden

anschließend aus diesen Gel-Schnitten isoliert (*MinElute Gel Extraction Kit, Qiagen, Düsseldorf*), mit Ethanol präzipitiert und in destilliertem Wasser resuspendiert. Die Konzentration der amplifizierten DNA-Fragmente wurde photometrisch (*Biophotometer 8,5 mm, Eppendorf AG, Hamburg*) ermittelt.

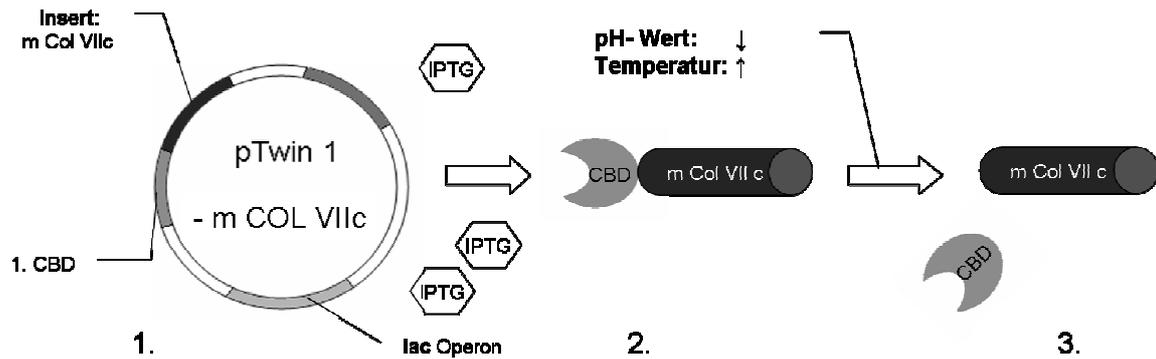
### Aufreinigung des Vektor-Plasmid aus *E.coli*-Bakterien

Als Vektor wurde der *pTwin1*-Vektor der Firma New England Biolabs (*New England Biolabs, Ipswich, USA*) verwendet (Abb. 4).



**Abb. 4. Schematische Darstellung des pTwin1-Vektors.** 1. CBD = 1. Chitin bindende Domäne, 2.CBD = 2. Chitin bindende Domäne, MCS = multi cloning site. Der pTwin1-Vektor verfügt neben einem Ampicillin Resistenzgen und dem lac Operon auch über zwei genetische Sequenzen, die für Chitin bindenden Domänen codieren. Die Positionen der Nukleotidsequenzen, die von den Restriktionsenzymen BamH I und Nco I als Schnittstellen erkannt werden, sind angedeutet (1.). Mit Hilfe dieser Schnittstellen kann ein DNA-Fragment (*Insert*) in den Vektor integriert werden (2.). Zeichnung modifiziert nach *IMPACT-Twin Manual, New England Biolabs*.

Der pTwin1-Vektor ermöglicht es, Proteine in Bakterien zu exprimieren, bei denen das gewünschte Protein (Zielprotein) an eine Chitin bindende Domäne gekoppelt vorliegt, die eine hohe Affinität zu Chitin hat und dadurch ein Aufreinigungsverfahren ermöglicht. Eine Abspaltung dieser Domäne kann durch Änderung von Temperatur und pH-Wert induziert werden, so dass das Zielprotein isoliert gewonnen werden kann (Abb.5).



**Abb. 5. Schematische Darstellung der Expression von Fusionsproteinen.**

IPTG = Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid. CBD = Chitin bindende Domäne. Durch Zugabe des künstlichen Induktors IPTG kann über das *lac Operon* die Expression eines Proteins, dessen genetischer Code im pTwin1-Vektor als Insert integriert ist, erreicht werden (1.). Das exprimierte Protein mCol VIIc ist als Fusionsprotein mit einer Chitin bindenden Domäne verbunden (2.). Durch Änderung von Temperatur und pH-Wert kann eine Abspaltung der CBD induziert werden.

PTwin1-Vektor tragende *E.coli*-Bakterien (*E.coli* ER 2566, New England Biolabs) lagerten in einem Glycerol-Stock bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Da der pTwin1-Vektor ein Gen enthält, das Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin verleiht, wurden die Bakterien auf einem Selektionsnährboden, hergestellt aus Agarose, LB-Medium (*Luria-Betani-Medium*, 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt [beide Difco Laboratories, Detroit, USA], 0,17 M NaCl [Roth, Karlsruhe], pH 7,5) und Carbencillin (Apotheke UKSH, Uni Lübeck, 1:1000 verdünnt) ausgestrichen. Die Nährböden wurden über Nacht im Inkubator (*Heraus Instruments GmbH, Hanau*) bei  $37^{\circ}\text{C}$  gelagert und am nächsten Morgen auf erfolgtes Bakterienwachstum hin untersucht. Gewachsene Bakterienkolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und erneut in 10 ml vorbereitetem LB-Nährmedium bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert. Das LB-Nährmedium enthielt Carbencillin, 1:1000 verdünnt. Am folgenden Tag wurden die Bakterienkulturen für 15 Minuten bei 6000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das Vektor-Plasmid aus dem Bakterienpellet mit Hilfe eines Kits (*Nucleospin Plasmid Kitt, Macherey-Nagel, Düren*) isoliert und aufgereinigt. Das aufgereinigte Vektor-Plasmid wurde in destilliertem Wasser resuspendiert und die Konzentration photometrisch gemessen.

#### **Restriktionsverdau der DNA-Fragmente und des Vektors**

Um den Einbau der mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente in den pTwin1-Vektor zu ermöglichen, mussten sowohl der Vektor als auch das DNA-Fragment mit ausgewählten Restriktionsendonukleasen inkubiert werden. Die Inkubation erfolgte jeweils in getrennten Ansätzen, zunächst mit dem Restriktionsenzym *Nco I* (*New England Biolabs*) und anschließend mit dem Enzym *BamH I* (*Fermentas Life Sciences Inc., Hanover, USA*). Dieser als Verdau bezeichnete Vorgang erfolgte jeweils für 24 Stunden bei 37°C im Inkubator. Dazu wurden 25 µl mCol7c-DNA sowie 25 µl pTwin1-Vektor in getrennten Ansätzen mit 5 µl 10x NEBuffer 4, 2 µl *Nco I*, 18 µl ddH<sub>2</sub>O gemischt. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Inaktivierung des Restriktionsenzym für 20 Minuten bei 65°C. Die einzelnen Ansätze wurden aufgereinigt und in 30 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Für die Aufreinigung wurde eine Säule (*S-400 HR Säule, GE Healthcare, Chalfont, England*) verwendet.

Für den folgenden zweiten Verdau wurden erneut 25 µl mCol7c-cDNA mit 2 µl *BamH I* (*Fermentas*), 5 µl 10x Buffer Tango (*Fermentas*) und 18 µl ddH<sub>2</sub>O gemischt und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte für 20 Minuten bei 80°C. Nach Aufreinigung über eine Säule (*S-400 HR Säule, GE Healthcare*) wurden Vektor und DNA-Fragment in 20 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und die Konzentration photometrisch gemessen.

#### **Herstellung chemisch kompetenter Zellen**

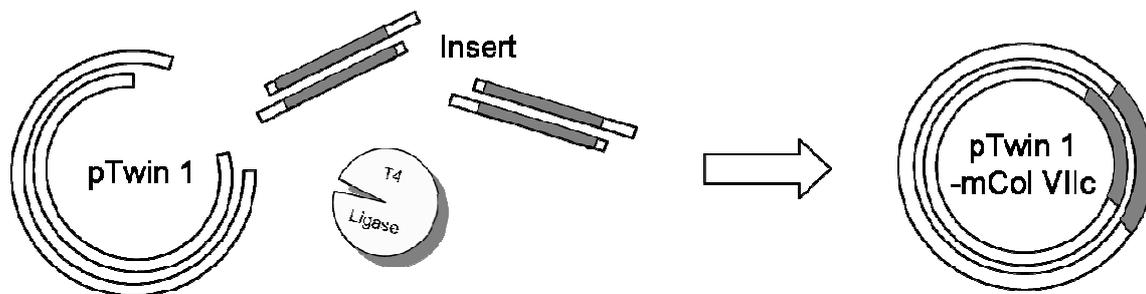
Nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode von Hanahan (40) wurden *E. coli*-Bakterien so behandelt, dass sie bei späteren Versuchen in der Lage waren, fremde Plasmid-DNA nach Änderungen der Temperatur in ihr Zellinneres aufzunehmen. Dazu wurden *E. coli*-Bakterien in 100 ml LB-Nährmedium angezüchtet, bis die optische Dichte, gemessen bei 600 nm, der Kultur etwa 0,4 betrug. Nach anschließender Zentrifugation für 5 min bei 2500 rpm und 4°C wurde das Bakterienpellet in 1,25 ml eiskalter MgCl<sub>2</sub>-Lösung (*Sigma, St. Louis, USA*) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde erneut abzentrifugiert und das Pellet in 25 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung (*Sigma*) resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, bevor das Pellet in 2 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert wurde. Von dieser Lösung wurden mehrere kleinere Proben aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

## Ligation von DNA und pTwin1-Vektor

Für die Ligation der mCol VIIc-DNA in den pTwin1-Vektor wurden mehrere Ligationsansätze vorbereitet. Ein Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

T4-DNA Ligase ( <i>invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA</i> )	1 $\mu$ l
5x T4-Ligase Buffer ( <i>invitrogen</i> )	4 $\mu$ l
pTwin1-Vektor (25ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
mCol VIIc-DNA (25ng/ $\mu$ l)	6 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l

Die Ansätze wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine Re-ligation des Vektors zu verhindern, wurden jedem Ligationsansatz zur Dephosphorylierung der DNA-Doppelstrangschnittstellen 3 min vor Ende der Inkubationszeit 2  $\mu$ l einer alkalischen Phosphatase (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, invitrogen*) hinzugefügt. Nach der Integration der mCol VIIc- DNA in den pTwin1-Vektor wurde der rekombinante Vektor als *pTwin1-mColVIIc* bezeichnet.



**Abb.6. Schematische Darstellung der Ligation.** Das Ligationsenzym T4 Ligase verbindet die geschnittenen Enden der DNA-Fragmente (Insert) mit den Schnittstellen am Vektor. Als Produkt dieser Reaktion entsteht ein Vektor, der genetische Information für das C-Fragment der NC-1 Domäne des murinen Kollagen Typ VII trägt ( pTwin 1 – mCol VIIc )

## Transformation

Für die Transformation von ligiertem Vektor in chemisch kompetente *E.coli*-Bakterien wurden 10  $\mu$ l des zuvor hergestellten Ligationsansatzes mit 100  $\mu$ l chemisch kompetenten *E.coli*-Bakterien gemischt. Der Ansatz wurde für 30 min. auf

Eis inkubiert, anschließend für 90 sec. bei 42°C im Wasserbad (*Köttermann Labortechnik, Hänigsen*) hitzegeschockt und danach erneut für 120 sec. auf Eis gelagert. Jeder Ansatz wurden mit 400 µl vorgewärmten LB-Medium gemischt und für eine Stunde bei 37°C und 200 rpm im Bakterienschüttler geschüttelt. Danach wurden von jedem Ansatz 100 µl auf einer antibiotikahaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank gelagert.

#### **Identifikation rekombinanter Klone mittels Kolonie-PCR**

Um die Bakterien zu identifizieren, die den rekombinanten *pTwin1-mCol VIIC-Vektor* aufgenommen hatten und über Nacht auf dem Selektionsnährboden gewachsen waren, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Durch eine Kolonie-PCR kann das Vorhandensein von bestimmten DNA-Abschnitten in Bakterien nachgewiesen werden. Für die Durchführung der PCR wurden die Primer Ssp DnaB und Mxe gemäß bekannten Sequenzierungsabschnitten im pTwin1-Vektor verwendet (*Invitrogen*) (Tab.2). Ein Master-Mix für insgesamt 25 PCR-Reaktionen wurde wie folgt vorbereitet:

5x GoTaq Flexi Buffer ( <i>Promega Corporation, Madison, USA</i> )	100 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub> -Lösung ( <i>Promega</i> )	40 µl
10 mM dNTP-Mix	10 µl
Ssp DnaB – Primer	10 µl ( 10 pmol/µl )
Mxe – Primer	10 µl ( 10 pmol/µl )
GoTaq ® DNA Polymerase ( <i>Promega</i> )	2,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 µl

Die einzelnen Kolonien auf einer Agarplatte wurden durchnummeriert, bevor mit einer sterilen Pipettenspitze vorsichtig die Oberfläche der Kolonie berührt wurde. Die Pipettenspitze wurde danach mehrfach in einer PCR-Tube mit 20 µl Master-Mix gerührt. Erneut erfolgte die PCR in der GeneAmp PCR System 9700 Maschine (*Applied Biosystems*). Dabei wurde das gleiche PCR-Programm verwendet wie

bei der ursprünglichen Amplifizierung der DNA-Fragmente. Die Kontrolle der Kolonie-PCR erfolgte mittels Agarose-Gel.

#### **Kontrollverdau rekombinanter Klone**

Bakterienkolonien, die positiv auf den pTwin1-mColl VIIc Vektor getestet worden waren, wurden mit einem sterilen Zahnstocher von der Agarplatte gepickt und in 10 ml antibiotikahaltigem LB-Medium über Nacht im Bakterenschüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde von jeder Kultur separat auf einer antibiotikahaltigen LB-Agarplatte ein Ausstrich nach der Drei-Ösen-Technik gemacht und die Platten anschließend im Brutschrank bei 37°C gelagert. Am folgenden Tag wurde von jeder Agarplatte eine Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 10 ml antibiotikahaltigem LB-Medium überführt. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Nach Ablauf der Übernachtsinkubation wurden die Kulturen für 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert und aus dem Bakterienpellet wurden die Plasmide mittels eines Miniprep-Kits isoliert (*Nucleo Spin Kits, Macherey und Nagel*). Diese Plasmide wurden erneut mit den Restriktionsenzymen *Nco I* und *BamH I* verdaut, um als Nachweis einer erfolgreichen Ligation das Insert mit einer Größe von 630 bp wieder aus den Plasmiden heraus zu schneiden. Die Analyse des Kontrollverdaus erfolgte in einem 1,5% Agarose Gel, das mit einem DNA-sensiblen Farbstoff (*GelStar Nucleic Acid Gel Stain, Ionza, 1:10.000 verdünnt*) versetzt war.

#### **Sequenzanalyse isolierter Bakterienplasmide**

Nach Durchführung der Kolonie-PCR und des Kontrollverdaus isolierter Vektoren wurde aus ausgewählten Bakterienkolonien die Plasmid-DNA isoliert (*NucleoSpin Plasmid-Kit, Macherey-Nagel*). Die Analyse der in die Vektoren eingebrachten DNA-Sequenzen erfolgte durch die Firma MWG, Ebersberg. Dazu wurden erneut die Primer Ssp DnaB und Mxe (*Invitrogen*) verwendet und zusammen mit den zu untersuchenden Plasmiden versendet (Tab.2).

Länge	Primer Sequenz ( 5´-3´)
20 Basen	<i>Ssp DnaB FP</i> : ACT GGG ACT CCA TCG TTT CT
18 Basen	<i>Mxe Intein RP</i> : GGC ACG ATG TCG GCG ATG

**Tab. 2. Nukleotidsequenz der Sequenzierungsprimer.** *Ssp DnaB* und *Mxe Intein* sind Bereiche von Nukleotidsequenzen im pTwin1-Vektor, mit deren Hilfe integrierte DNA-Fragmente analysiert werden können.

Nach Erhalt der Sequenzierungsdaten wurden die DNA-Sequenzen der pTwin1-mCol VIIc-Vektoren mit der DNA-Sequenz abgeglichen, die für das C-Fragment der NC1-Domäne des murinen Kollagen Typ VII kodiert. Dafür wurde Software vom ExPASy Proteomics Server ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)) und von EMBL-EBI ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) verwendet. Mit dem Programm *ProtParam* der ExPASy-Datenbank (UniProt Knowledgebase, [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)) wurden die Proteinparameter für das C-Fragment der NC1-Domäne berechnet:

Basenpaare	630
Anzahl Aminosäuren	210
Extinktionskoeffizient bei 280 nm	34950/M cm
Größe	22,82 kDa
Isoelektrischer Punkt	pH: 5,85

Aus dem berechneten Extinktionskoeffizienten geht hervor, dass bei einer optischen Dichte von 1,569 bei 280 nm das Protein in einer Konzentration von 1 mg/ml vorliegt.

### SDS-Page

Von den Bakterienkolonien, die in der Kolonie-PCR und im Kontrollverdau positiv auf das Vorhandensein des pTwin1-mColl VIIc Vektors getestet worden waren, wurde eine Testexpression durchgeführt. Hierfür wurden erneut in 10 ml LB-Medium Primärkulturen angelegt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Kulturen mit 10 µl 0,5 molarem Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid

(IPTG, [Sigma, St. Louis, USA]) induziert und für weitere drei Stunden inkubiert, bevor sie für 30 min. abzentrifugiert wurden. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 2 ml einer eiskalten phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, *phosphate buffered saline*: 80g/l NaCl [Roth], 2g/l KCL [Merck], 14,4 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [Merck], in ddH<sub>2</sub>O, zehnfach verdünnt, pH: 7,4) resuspendiert. Jede 2 ml-Bakterienlösung wurde dreimal für 20 sec. mit Ultraschall behandelt (*Sonopuls UW 2070, Bandelin electronic, Berlin*), wobei vor jedem Behandlungszyklus 20 µl 0,1 M Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF [Roth]) hinzugefügt wurden. Anschließend wurden diese Proben für 30 min bei 4°C mit 13.000 rpm zentrifugiert. Von jeder Probe wurden 50 µl abgenommen, mit 50 µl 2x Laemli-Sample Buffer gemischt, für 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend bei -80°C eingefroren.

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli (56) wurde zur weiteren Analyse der hergestellten Proben verwendet. Bei diesem Verfahren können Proteine nach Behandlung mit einem anionischen Detergenz durch das Anlegen einer elektrischen Spannung nach ihrem spezifischen Gewicht getrennt werden. Für die SDS-Page-Analyse wurde ein diskontinuierliches System aus Sammel- und Trenngel verwendet:

Gelbestandteile		Trenngel: 12%	Sammelgel: 5%
ddH <sub>2</sub> O		2,65 ml	2,94 ml
1,5M Tris, pH 8,8	(Roth)	1,35 ml	-
0,5M Tris, pH 6,8	(Roth)	-	700 µl
30% Acrylamid	(AppliChem)	4 ml	812 µl
100% Glycerol	(AppliChem)	500 µl	250 µl
1M Glycin	(Merck)	1 ml	-
0,5M EDTA, pH 8	(Roth)	-	40 µl
10% SDS	(Merck)	400 µl	200 µl
TEMED	(Roth)	12 µl	12 µl
10% APS	(Sigma)	150 µl	100 µl

In die Geltaschen des Sammelgels wurden je 10 µl der zu untersuchenden Probe pipettiert. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte in einer Elektrophoresekammern (*Mini-PROTEAN 3, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA*) für 90 min bei 75 mA. Die Kammer wurde mit einem Laufpuffer (25 mM Tris-base [Roth], 192 mM Glycin, 1% SDS [Merck], pH 8,3) aufgefüllt. Anschließend wurden

die SDS-Gele für 20 min in Coomassie Brilliant-Blue (*2g/l Coomassie-Brilliant Blue [Sigma-Aldrich], 450 ml Methanol >99,9% [Roth], 100 ml Essigsäure 100 % [Roth], mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt auf 1000 ml Gesamtvolumen*) gefärbt und anschließend zweimal für 10 min in Coomassie-Entfärbelösung (*450 ml Methanol >99,9% [Roth], 100 ml Essigsäure 100 % [Roth], mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt auf 1000 ml Gesamtvolumen*) entfärbt.

#### **Proteintransfer aus SDS-Gelen auf Nitrocellulosemembranen**

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine in den SDS-Gelen wurden mittels Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dazu wurde auf ein SDS-Gel unter möglichst strengem Luftausschluss eine Nitrocellulosemembran gerollt und das Gel mit der Nitrocellulosemembran zwischen jeweils zwei Filterpapieren und Schwämmen in eine Blotkassette (*cell, Bio-Rad, München*) eingespannt. Die Kassette wurde mit Transfer-Puffer gefüllt (*100 ml Tris-Glycin 10-fach [Roth], 200 ml Methanol >99,9% [Roth], 700 ml destilliertes Wassers*) und in einer Transferkammer befestigt. Der Transfer erfolgte bei 4°C für 17 Stunden, wobei an die Transferkammer eine Spannung von 30 mV (*Power Pack HC, Bio Rad*) angelegt wurde. Zur Kontrolle der Blot-Technik wurde die Nitrocellulosemembran nach erfolgtem Transfer mit einer Fast-Green-Färbelösung (*1g Fast Green [Sigma], 100ml Methanol >99,9% [Roth], 50 ml Essigsäure 100 % [Roth] aufgefüllt mit ddH<sub>2</sub>O auf 1000 ml Gesamtvolumen*) für etwa 5 min angefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet.

#### **Immundetektierung von Fusionsproteinen**

Die Nitrocellulosemembranen wurde zunächst mit 5% Magermilchpulver (*Merck*), 1% Bovinen Serum Albumin (*BSA 96 %, Sigma*) in TBST; (*TBST; 0,02 M Tris-base [Roth], 0,15 M NaCl [Roth], 0,01% Tween-20 [Sigma], pH 7,5*) für drei Stunden inkubiert, um eine unspezifische Bindung der später zugegebenen Antikörper zu verhindern. Nach der Inkubation wurden die Membranen dreimal für 10 min mit TBST gewaschen und anschließend mit 3 % Magermilchpulver, 1% BSA und dem Primärantikörper, 1:1000 verdünnt in TBST, inkubiert. Als Primärantikörper wurde

ein muriner monoklonaler Anti-Chitin-bindende-Domäne Antikörper (*New England Biolabs*) verwendet. Dieser Antikörper eignet sich zur Detektierung von Proteinen, die als Fusionsprotein mit einer Chitin bindenden Domäne verbunden sind. Die Inkubation mit dem Primär-Antikörper erfolgte für drei Stunden bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen der Membran, wobei zweimal für zehn Minuten und zweimal für fünf Minuten mit TBST gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für weitere drei Stunden. Der Sekundärantikörper wurde in 3% Magermilch, 1% BSA in TBST 1:1000 verdünnt. Da als Primärantikörper ein muriner Antikörper zum Einsatz gekommen war, wurde ein Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelter polyklonaler anti-Maus-Immunglobulin (IgG) Kaninchenantikörper (*DAKO, Glostrup, Dänemark*) als Sekundärantikörper gewählt. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Membranen dreimal für jeweils zehn Minuten mit TBST gewaschen. Die Entwicklung der Membranen erfolgte mit in destilliertem Wasser gelösten Diaminobenzidin (*DAB [Merck], 1 Tablette gelöst in 15 ml ddH<sub>2</sub>O*) nach Zugabe von 10 µl Wasserstoffperoxid (*Merck*). Nach der Entwicklung wurden die Membranen in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

#### **Proteinexpression des Intein-Fusionsprotein mCol VIIc**

Plasmide, in denen durch Sequenzanalyse das Insert nachgewiesen worden war, wurden in chemisch kompetente *E.coli* (*Rosetta blue*-Zellen) transformiert. Bakterienkolonien, die nach erfolgter Transformation auf antibiotikahaltigem Nährboden gewachsen waren, wurden vorsichtig mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt. Die Pipettenspitzen wurden in 50ml-Falcon-Tubes (*Sarstedt, Nümbrecht*), die mit 10 ml carbencillinhaltigem LB-Medium gefüllt waren, abgeworfen. Die Falcon-Tubes wurden bei 37°C über Nacht im Bakterienrüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden Kryobanken (*Cryobank, Mast Diagnostica, Merseyside, England*) von jeder Kultur hergestellt und bei -80°C gelagert. Zur Anzucht einer Sekundärkultur wurden 500 ml carbencillinhaltiges LB-Medium mit 5 ml der zuvor hergestellten Bakterienkultur beimpft. Diese Kultur wurde für vier Stunden im Bakterienrüttler bei 37°C inkubiert, bis die optische Dichte der Bakterienkultur, gemessen bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) einen Wert zwischen 0,5 und 0,7 erreicht hatte. Zu der Kultur wurden 500 µl 0,5 molares IPTG (*Sigma*) pipettiert, bevor für weitere vier Stunden inkubiert wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte eine Zentrifugation für 10 min

bei 4°C und 6000 rpm. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml eiskaltem *Lyse-Puffer* (1 M NaCl [Roth], 20 mM HEPES [Roth], 0,1% Tween-20 [Merck], 1mM EDTA [Merck], pH 8,5) resuspendiert und anschließend dreimal für jeweils 30 sek. mit 0,7er Cycle mit Ultraschall beschallt, um die Zellwände der Bakterien aufzubrechen. Vor jeder Ultraschallbeschallung wurden 40 µl 0,1 molar PMSF (Roth) hinzu pipettiert. Nach dieser Behandlung wurde die Bakterienlösung für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und eingefroren. Jeweils eine Probe der Bakterienlösung von 50 µl wurde nach der Ultraschallbehandlung und nach dem Zentrifugieren für spätere Analysen genommen.

#### **Affinitätsaufreinigung des mCol VIIc-Protein**

Der eingefrorene Überstand des Bakterienlysats wurde langsam auf Eis aufgetaut. In eine Glassäule wurden 20 ml einer Chitin-Matrix (*Chitin Beads, New England Biolabs*) gefüllt. Die Säule wurde mit 100 ml *Lyse-Puffer* equilibriert. Das aufgetaute Bakterienlysats wurde langsam durch die Säule gepumpt und der Durchfluss wurde aufgefangen. Anschließend wurde die Säule mit *Lyse-Puffer* gewaschen. Um die Abspaltung der Chitin bindenden Domäne vom Zielprotein zu erreichen, wurde die Säule mit 60 ml mit *Induktions-Puffer* (1 M NaCl [Roth], 20 mM HEPES [Roth], 0,1% Tween-20 [Merck], 1mM EDTA [Merck], 30 mM DTT [Merck], pH 6,5) schnell gespült. Nach Verschluss der Säule erfolgte die Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Morgen wurden die mCol VIIc-Proteine aus der Säule mit 60 ml *Elutions-Puffer* (500 mM NaCl [Roth], 20 mM HEPES [Roth], 0,1% Tween-20 [Merck], 1mM EDTA [Merck], pH 8,5) eluiert. Dabei wurde der durchlaufende Elutions-Puffer in Fraktionen von jeweils einem Milliliter aufgefangen. Zum Nachweis des eluierten mCol VIIc-Proteins erfolgte die Analyse der einzelnen Fraktionen mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese.

#### **Proteinaufreinigung mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie**

Um den Reinheitsgrad des eluierten mColVIIc-Proteins nach der Affinitätsaufreinigung an der Chitinsäule weiter zu erhöhen, wurde eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Die dazu notwendigen Proteinparameter des mCol VIIc-

Proteins wurden aus der Datenbank von ExPasy (*UniProt Knowledgebase*, [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)) übernommen. Vor der Durchführung der Anionenaustauschchromatographie wurden die eluierten Proteinfractionen mit Hilfe einer Säule (*PD-10 Desalting Column, GE Healthcare*) in einen *Chromatographie-Puffer* (25 mmolar *Bis-Tris [Roth]*, gasfrei filtriert, pH 6,7) umgepuffert und aufkonzentriert. Der pH-Wert des *Chromatographie-Puffers* wurde eine pH-Einheit über dem isoelektrischen Punkt des mCol VIIc-Proteins eingestellt (*pH-Meter ph526, MultiCal WTW, Weilheim*). Durch die Änderung des pH-Wertes sollten sämtliche mCol VIIc-Proteine als Anionen im *Chromatographie-Puffer* vorliegen, um an der Chromatographiesäule zu binden. Für die Ionenaustauschchromatographie wurde eine *HiTrap Q FF 5 ml Anionenaustauschsäule (GE Healthcare Europe, Braunschweig)* verwendet, die zu Beginn mit 20 ml *Chromatographie-Puffer* equilibriert wurde. Photometrisch wurde die optische Dichte des durchlaufenden *Chromatographie-Puffers* bei 280 nm ( $OD_{280}$ ) bestimmt und als Ausgangswert für spätere Messungen festgelegt.

Mit einer Pumpe (*Pump P-1, Amersham Biosciences Europe, Freiburg*) wurde die umgepufferte Proteinlösung durch die Anionenaustauschsäule gepumpt. Anschließend wurde *Chromatographie-Puffer* durch die Ionenaustauschsäule geleitet und der  $OD_{280}$ -Wert des durchlaufenden Puffers gemessen, bis dieser  $OD_{280}$ -Wert den  $OD_{280}$ -Ausgangswert erreicht hatte. Für die Elution des mColVIIc-Proteins aus der Säule wurde ein *Hochsalzpuffer* (25 mmolar *Bis-Tris [Roth]*, 1 M *NaCl [Roth]*, gasfrei filtriert, pH 6,7) hergestellt. In ein System aus zwei kommunizierenden Röhren wurden 105 ml *Chromatographie-Puffer* in die erste Röhre und 100 ml *Hochsalzpuffer* in die zweite Röhre gefüllt. In die erste Röhre wurde zusätzlich ein kleinerer Magnetfisch gelegt und beide Röhren wurden auf einen magnetischen Rührer (*Magnetrührer MSH 300, lab4you GmbH, Berlin*) gestellt. Die Röhren wurden an die Pumpe angeschlossen und anschließend wurde mit konstanter Geschwindigkeit aus dem System der kommunizierenden Röhren durch die Ionenaustauschsäule gepumpt, um eine gleichmäßig ansteigende Änderung des Salzgehaltes im durchlaufenden Puffer zu erreichen. Mit einem Fraktionensammler (*RediFrac, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden*) wurde der durchlaufende Puffer in Fraktionen zu jeweils einem Milliliter aufgefangen. Für die letzten zehn Fraktionen wurde die Ionenaustauschsäule mit 10 ml reinem *Hochsalzpuffer* gespült. Von jeder einzelnen Fraktion wurden 20 µl in eine Kammer einer 96-Loch Mikrotiterplatte

(Nunc, Roskilde, Dänemark) pipettiert und 80 µl einer Protein Assay-Lösung (*Bio Rad*) hinzu gegeben. Wird diese Assay-Lösung mit einer proteinhaltigen Probe vermischt, so tritt ein Farbumschlag von rot nach blau ein. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die Platte wurde kurz auf einem Schüttler (*TPM 4, Sarstedt, Nümbrecht*) inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm Wellenlänge gemessen (*Wallac Victor<sup>3</sup> 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer, Waltham, USA*). Die Messdaten wurden digital ausgewertet. Von den Fraktionen, bei denen eine hohe Absorption gemessen worden war, wurde 50 µl für eine weitere SDS-PAGE Analyse abgenommen.

#### **Bestimmung der Proteinkonzentration**

Nach der SDS-PAGE-Analyse der einzelnen Proben wurden die Fraktionen, in denen das mCOI VIIc-Protein eluiert worden war, mit Amicon Ultra Filtern (*Millipore, Billerica, USA*) aufkonzentriert und anschließend in PBS umgepuffert. Ausgehend von den Proteinparametern wurde die Konzentration des mCol VIIc-Proteins photometrisch bestimmt.

#### **Optimierung der Bedingungen des mCol-VIIc ELISA**

Um die optimalen Bedingungen für den mCol-VIIc ELISA zu ermitteln, wurden die Vertiefungen einer 96-Loch Mikrotiterplatte mit verschiedenen Konzentrationen des reinen mCol VIIc-Proteins beladen, und es wurde eine Titration nach einem Schachbrettverfahren durchgeführt. Hierfür wurden zunächst mit Hilfe eines Coating-Puffers (*Carbonat-/ Bicarbonat Puffer [Roth], pH 9,6*) unterschiedlich stark verdünnte Lösungen des mCol VIIc-Proteins hergestellt und diese dann in jeweils eine Reihe einer Mikrotiterplatte aufgetragen, so dass jede Vertiefung in dieser Reihe dieselbe Menge an Protein enthielt. Die niedrigste Proteinmenge wurde in die Vertiefungen der Reihe A und B aufgetragen (0,05 µg Protein pro Vertiefung), wobei sich die Proteinmenge pro Loch dann in den nächsten zwei folgenden Reihen jeweils verdoppelte.

Das Serum einer nachweislich erkrankten Maus wurde als Standardserum verwendet und in verschiedenen Verdünnungen von 1:5.000 bis 1:40.000 in Verdünnungspuffer (*1% BSA 96% [Roth] in PBS-T, pH 7,2*) eingesetzt. Jede Verdünnung

wurde in drei Spalten der ELISA-Platte aufgetragen. Nach Inkubation und einem folgenden Waschschrift wurde die ELISA-Platte mit einem HRP-gekoppelten Detektionsantikörper (*polyklonaler Kaninchen Anti-Maus-IgG Antikörper [DAKO]*), 1:10.000 in Verdünnungspuffer beladen. Nach einer erneuten Inkubation von einer Stunde erfolgte die Entwicklung des ELISAs mit einer OneStep Turbo-TMB-ELISA Substratlösung (*Bio-Rad*) und 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Die Absorption nach erfolgtem Farbumschlag in den Kammern der ELISA-Platte wurde bei 450 nm Wellenlänge gemessen (*Wallac Victor<sup>3</sup> 1420 Multilabel Counter*).

#### **Immunisierung von Mäusen mit GST-mCol VIIc-Protein**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Seren stammten von Mäusen, die im Rahmen einer Untersuchung im aktiven Mausmodell zum Einfluss des Haupt-histokompatibilitätskomplexes auf die Entwicklung von Autoantikörpern mit einem rekombinanten GST-mCol VIIc immunisiert worden waren (79). Für die Immunisierung wurden Tiere von vier verschiedenen Mäusestämmen verwendet: SJL- (n = 9), B10Q- (n = 7), B10S- (n = 4) und MRL-Mäuse (n = 4). Zur Induktion der EBA in den Mäusen wurde nach einer bereits publizierten Methode verfahren (7, 89). Die Mäuse wurden wiederholt mit 60 µg rekombinantem GST-mCol VIIc immunisiert. Das GST-mCol VIIc war in 60 µl des Adjuvants TiterMax (Alexis, Lörrach) gelöst und wurde in die Fußsohlen der Tiere injiziert. Nach vier, sechs, acht und zehn Wochen wurden die Tiere auf das Auftreten von Blasen und Erosionen hin untersucht und diese Hauterscheinungen wurden mittels eines Score-Systems klassifiziert, das das Ausmaß der befallenen Hautareale berücksichtigte. Die Mausearbeiten wurden von Frau Dipl. Biol. Susen Müller durchgeführt.

#### **Detektierung von Antikörpern in Mäuseseren mittels ELISA**

Für die Durchführung des ELISA wurde eine Lösung des mCol VIIc-Proteins in Coating-Puffer mit einer Konzentration von 5 µg/ml hergestellt. In jede Kammer einer 96-Loch Mikrotiterplatte (*Nunc*) wurden 100 µl dieser Lösung pipettiert, so dass eine Proteinkonzentration von 0,5 µg Protein pro Kammer erreicht wurde. Um die ELISA-Methode mit der im Labor bereits etablierten Methode vergleichen

zu können, wurden weitere Platten nach einem publizierten Verfahren vorbereitet (90).

Die Mikrotiterplatten wurden mit einer Klebefolie versiegelt und über Nacht bei 4°C im Kühlraum gelagert. Nach einem Waschvorgang wurden die Kammern mit 200 µl eines *Blockierungs- /Verdünnungspuffer* beladen und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert.

Nach einem erneuten Waschschrift wurden pro Kammer je 100 µl der zu untersuchenden Mäuseseren, 1:20.000 mit Verdünnungspuffer verdünnt, geladen. Alle Proben wurden dreimal aufgetragen. Jeweils die ersten drei Kammern einer Reihe auf jeder ELISA-Platte wurden mit einem Standardserum beladen, das in absteigender Reihenfolge jeweils um den Faktor 2 stärker verdünnt war.

Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden auf einem Schüttler. Für die Detektion der murinen Antikörper nach Bindung an das Antigen wurde ein polyklonaler Kaninchen Anti-Maus-IgG Antikörper (*DAKO*) verwendet. Dieser HRP-gekoppelte Detektierungsantikörper wurde in Verdünnungspuffer 1: 10.000 verdünnt. Nach dem Waschen der ELISA-Platte wurden in jede Kammer 100 µl des verdünnten Detektionsantikörpers pipettiert, bevor die Platten für eine weitere Stunde inkubiert wurden. Die Entwicklung erfolgte nach einem letzten Waschschrift durch Zugabe von 50 µl OneStep Turbo TMB Substratlösung (*Bio Rad*) pro Kammer. Die ELISA-Platten wurden für fünf Minuten auf dem Schüttler geschüttelt, bevor die stattgefundenen Farbreaktion durch Zugabe von 50 µl Stop-Lösung ( $1\text{ M H}_2\text{SO}_4$ ) gestoppt wurde. Die Absorption nach erfolgtem Farbumschlag in den Kammern der ELISA-Platte wurde bei 450nm Wellenlänge gemessen (*Wallac Victor<sup>3</sup> 1420 Multilabel Counter*). Die Messdaten wurden digital ausgewertet

#### **Statistik**

Die statistische Auswertung der Daten wurde digital am Computer durchgeführt. Hierfür wurden das Programm Excel® und eine handelsüblicher PC verwendet. Um das Vorliegen einer linearen Regression der Messdaten festzustellen, wurden die Extinktionswerte in einen Log-Logit- Plot überführt. Hierfür wurden die Werte zunächst normiert (n):

$$n = \frac{w - u}{o - u}$$

*w = gemessener Extinktionswert; maximaler Extinktionswert (o) und kleinster gemessener Extinktionswert (u) einer Messreihe*

Anschließend wurden die normierten Werte in die Logit-Gleichung (L) überführt:

$$L = \ln\left(\frac{n}{1-n}\right)$$

*n = normierte Messwerte; ln= Logarithmus naturalis.*

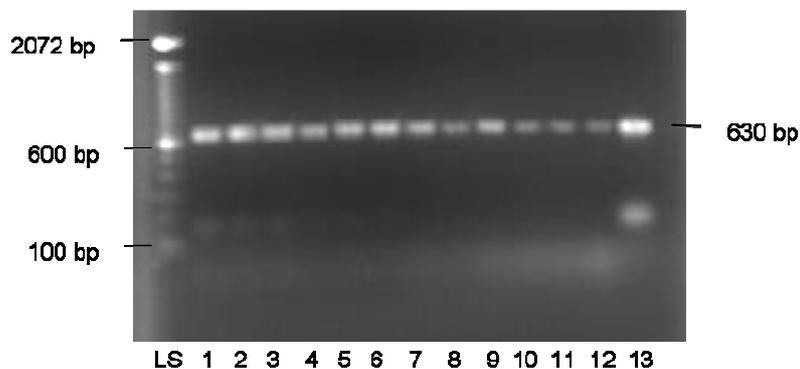
Die logit-Werte eines definierten Standardserums wurden gegen die logarithmierte Verdünnung der Proteinkonzentration aufgetragen. Mittels linearer Regression wurde eine Kalibrierungsgrade erstellt und die Funktion der Gerade ermittelt. An Hand dieser Funktionsgleichung konnten die Antikörpertiter der untersuchten Proben ermittelt werden.

Die Prüfung auf lineare Regression der Mittelwerte erfolgte durch die Berechnung des Korrelationskoeffizienten r. Für den Vergleich der ermittelten Korrelationskoeffizienten wurde die Software von VassarStats ([www.faculty.vassar.edu/lowry/vassarStats.html](http://www.faculty.vassar.edu/lowry/vassarStats.html)) verwendet.

## Ergebnisse

### Amplifizierung der mCol VIIc-DNA mittels PCR

Das 630 bp große DNA-Fragment, welches für das C-Fragment der NC1-Domäne des Kollagen VII kodiert, konnte mittels PCR erfolgreich amplifiziert werden. Als Template diente der pGEX-mCol VIIc-Vektor und als Primer wurden die zuvor generierten Forward (FP)- und Reverse (RP)- Primer verwendet. Die Analyse der PCR-Ansätze erfolgte mittels Gelelektrophorese. Das mCol VIIc- DNA Fragment migrierte in der Agarosegelelektrophorese gemäß seiner berechneten Größe von 630 bp (Abb. 7).



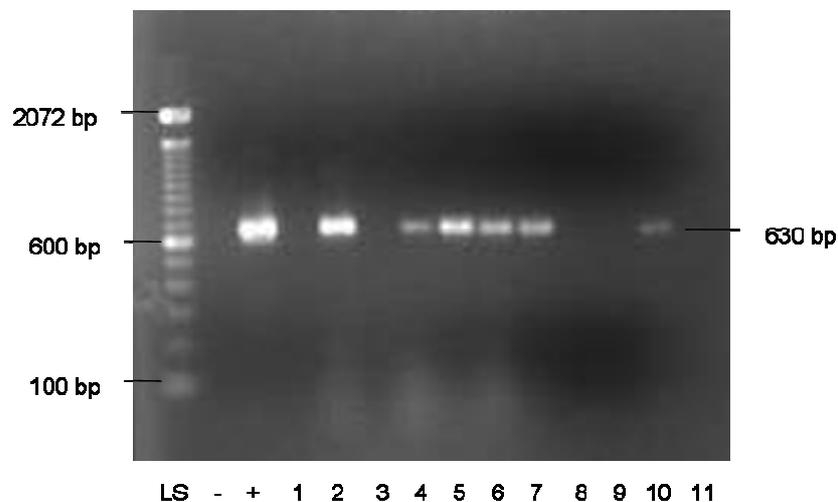
**Abb.7. Amplifizierung des mCol VIIc DNA-Fragments.** Agarosegel nach erfolgter Gelelektrophorese. In Spur 1 bis 13 sind Proben verschiedener PCR-Ansätze geladen. Das DNA-Fragment stellt sich in Spur 1 bis 13 als helle Bande bei einer Größe von 630 bp da. LS: DNA-Längenstandard 100 bp-Marker (*Invitrogen*).

### Herstellung rekombinanter Plasmide

Nach der erfolgreichen Amplifizierung wurden die mCol VII c- DNA Fragmente aus dem Agarosegel isoliert und aufgereinigt. Die DNA-Fragmente und der pTwin1-Vektor wurden separat nacheinander mit den Restriktionsendonukleasen Nco I und BamH I inkubiert. Die Schnittstellen im DNA-Doppelstrang des pTwin1-Vektors wurden mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase dephosphoryliert, um eine Religation des geschnittenen Vektors zu verhindern. In der anschließend erfolgten Ligation wurden die DNA-Fragmente mittels einer Ligase in den pTwin1-Vektor eingebaut. Die so entstandenen pTwin1-mCol VIIc –Plasmide wurden in chemisch kompetente E.coli –Bakterien transformiert.

### Untersuchung auf Vektor tragende Bakterien mittels Kolonie-PCR

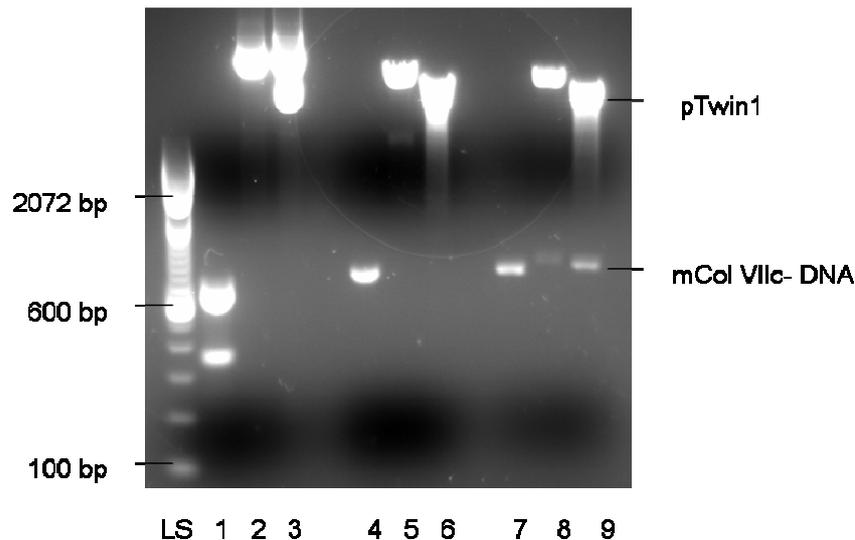
Nach der Transformation des rekombinanten pTwin1-mColVIIc-Vektors in *E.coli*-Bakterien erfolgte mittels Kolonie-PCR die Suche nach den Bakterienkolonien, die den Vektor aufgenommen hatten. Dazu wurden alle Bakterienkolonien, die nach der Transformation über Nacht auf einem Selektionsnährboden gewachsen waren, durchnummeriert und von jeder Kolonie wurden wenige Bakterien mit einer sterilen Pipettenspitze für die Kolonie-PCR gepickt. Die Analyse der einzelnen PCR-Ansätze erfolgte anschließend durch Gelelektrophorese (Abb. 8).



**Abb.8. Analyse von verschiedenen Bakterienkolonien nach der Transformation durch Kolonie-PCR.** In den PCR –Ansätzen, die in Spur 2, 4 - 7 und 10 geladen wurden, konnte das 630 bp große DNA-Fragment des mCol VIIc erfolgreich amplifiziert werden. Somit war in diesen Bakterienzellen die Transformation erfolgreich. Der erfolglose Nachweis des DNA-Fragmentes in den Spuren 1, 3, 8,9 und 11 zeigt, dass die Bakterienkolonien, deren PCR-Proben hier geladen wurden, den pTwin1-mColVIIc-Vektor nicht aufgenommen hatten. LS = DNA-Längenstandard 100 bp Marker (Invitrogen). + = Positivkontrolle, mCol VIIc DNA-Fragment, - = Negativkontrolle eines PCR-Ansatzes ohne Template.

### Restriktionsverdau rekombinanter pTwin1-mCol VIIc-Vektoren

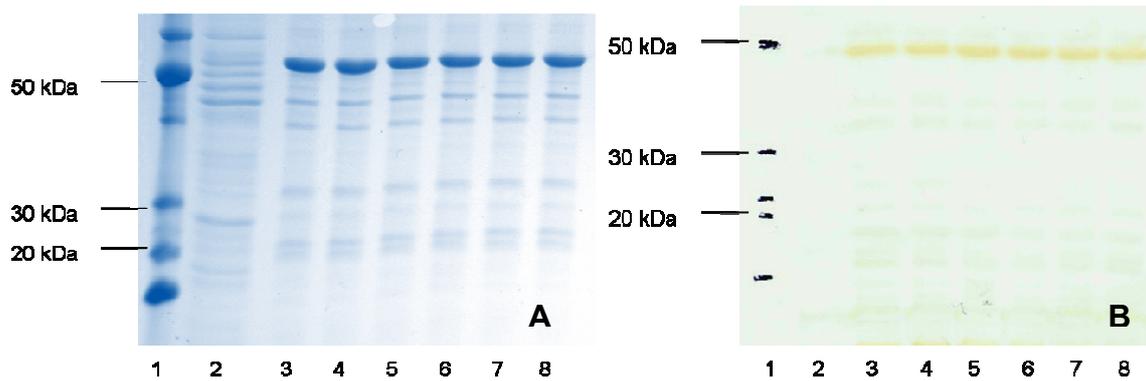
Nach der Kolonie PCR wurden die positiven Klone ausgewählt, um die Plasmide isolieren zu können. Die Analyse der Plasmide erfolgte durch Restriktionsverdau mit BamH I und Nco I und anschließender Agarosegelelektrophorese. Klone, in denen das 630er Insert nachgewiesen werden konnte, wurden weiterverwendet (Abb. 9).



**Abb.9. Restriktionsverdau des pTwin1-mCol VIIc-Vektors.** Nach dem Restriktionsverdau mit den beiden Enzymen Nco I und BamH I lässt sich der pTwin1-mCol VIIc- Vektor wieder in das mCol VIIc- DNA Fragment und pTwin1-Vektor zerlegen. Das mCol VIIc-DNA Fragment (630 bp) und der pTwin1-Vektor (7375 bp) werden getrennt im Agarosegel sichtbar (*Spur 9*). *Spur 8*: pTwin1-Vektor nach Verdau mit dem ersten Enzym Nco I. *Spur 4 und 7*: Reine mCol VIIc-DNA als Kontrolle. *Spur 5 und 6*: Verdau eines pTwin1-Vektors, in dem die mCol VIIc-DNA nicht nachgewiesen werden konnte. *Spur 7 und 8*: Verdau von reinem pTwin1-Vektor als Kontrolle. LS: DNA-Längenstandard (Invitrogen).

### SDS-Analyse und Immundetektierung von Fusionsproteinen

Von jeder Bakterienkolonie, in der durch die Kolonie-PCR der pTwin1-mCol VIIc – Vektor nachgewiesen worden war, wurde eine Mini-Proteinexpression durchgeführt. Die Bakterien wurden über Nacht in LB-Nährmedium inkubiert und die Expression des Fusionsproteins wurde durch die Zugabe von IPTG induziert. Nach erneuter Inkubation erfolgte die Lyse der Bakterienzellen durch die Anwendung von Ultraschall. Das Lysat der Zellen wurde auf ein Polyacrylamid-Gel geladen und anschließend durch das Anlegen einer elektrischen Spannung aufgetrennt. Um die aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen, wurde das Gel mit Coomassie Brilliant-Blau gefärbt (Abb.10 A). Für das Fusionsprotein, bestehend aus der Chitin-bindenden Domäne und dem C-Fragment des Kollagen Typ VII, war eine Größe von 48 kDa berechnet worden, da die Größe des C-Fragmentes 23 kDa beträgt und die Größe der Chitin-bindenden Domäne mit 25 kDa angegeben wird (*New England Biolabs*).



**Abb. 10: Expression und Immundetektierung von Fusionsproteinen.** Auf ein SDS-Gel (Sammelgel: 5% SDS, Trenngel: 12 % SDS) wurden in den *Spuren* 3 bis 8 Proben von verschiedenen Bakterienkulturen geladen, in denen der pTwin1-mCol VIIc-Vektor nachgewiesen worden war. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit 90 mA für eine Stunde. *Spur 1* = Molekulargewichtsmarker (Invitrogen). *Spur 2* = Probe eines E.coli- Bakteriums, das nicht Träger des pTwin1-mCol VIIc-Plasmides war (Wildtyp). Das exprimierte Fusionsprotein migriert im SDS-Gel entsprechend seiner berechneten Größe von 48 kDa (**A**).

Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran kann das Fusionsprotein mittels Westernblot-Technik und eines Antikörpers, der gegen die Chitin-bindende Domäne (CBD) gerichtet ist, sichtbar gemacht werden. Angefärbte Proteinbanden sind bei ca. 48 kDa erkennbar (**B**).

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine in dem SDS-Gel wurden mittels Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran mit einem murinen anti-CBD Antikörper inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Inkubation mit einem Sekundärantikörper. Hierfür wurde ein polyklonaler, HRP-gekoppelter anti-Maus-IgG Kaninchenantikörper verwendet. HRP katalysiert eine Farbreaktion, so dass nach Zugabe von in destilliertem Wasser gelöstem Diaminobenzidin auf der Membran gebundene Antikörper sichtbar gemacht werden können. Mit Hilfe dieser Methode konnten deutliche Banden bei etwa 48 kDa sichtbar gemacht werden, entsprechend der Größe des Fusionsproteins (Abb.10 B).

### Sequenzierung rekombinanter Klone

Die Sequenz der mCol VIIc-DNA, die in den pTwin1-Vektor integriert worden war, sollte auf Übereinstimmung mit der bekannten DNA-Sequenz des C-Fragmnetes des murinen Kollagen Typ VII überprüft werden. Hierfür wurden aus den Bakterienkolonien, die erfolgreich auf das Vorhandensein des pTwin1-mCol VIIc-Vektors getestet worden waren, Plasmide isoliert. Die weitere Sequenzierung wurde von

der Firma Firma MWG, Ebersberg durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzierungsdaten in Form einer DNA-Sequenz wurden mit Hilfe der Software vom ExPASy Proteomics Server ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)) und von EMBL-EBI ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) analysiert. Zunächst wurde die DNA-Sequenz der untersuchten Plasmide in eine Aminosäuresequenz übersetzt und anschließend mit der bekannten Aminosäuresequenz des mCol VIIc-Fragmentes verglichen (Abb.11).

```

mCol7c;          1 VAGVDGAPASVVVRTAPEPEVGSVSKLQILNASSDVLRVTTWVGVPGATSYK
                  |||
C1-P1-01;       1 VAGVDGAPASVVVRTAPEPEVGSVSKLQILNASSDVLRVTTWVGVPGATSYK

mCol7c;          51 LAWGRSEGGPMetKHRILPGNKESAEIRDLEGGVSYSVRVTTALVGDREGA
                  |||
C1-P1-01;       51 LAWGRSEGGPMetKHRILPGNKESAEIRDLEGGVSYSVRVTTALVGDREGA

mCol7c;          101 PVSIVITTPPATPALLETQVVQSGEHSLRLRWEVPGAPGFRLHWQPEG
                  |||
C1-P1-01;       101 PVSIVITTPPATPALLETQVVQSGEHSLRLRWEVPGAPGFRLHWQPEG

mCol7c;          151 GQEQSLTLGPESNSYNLVGLEPATKYQVWLTVLGQTGEGPPRKVTAYTEP
                  |||
C1-P1-01;       151 GQEQSLTLGPESNSYNLVGLEPATKYQVWLTVLGQTGEGPPRKVTAYTEP

mCol7c;          201 SHIPSTELRVVD          212
                  |||
C1-P1-01;       201 SHIPSTELRVVD          212

Identity:        210/210 (100%)
Similarity:      210/210 (100%)
Gaps:            0/210 (0.0%)

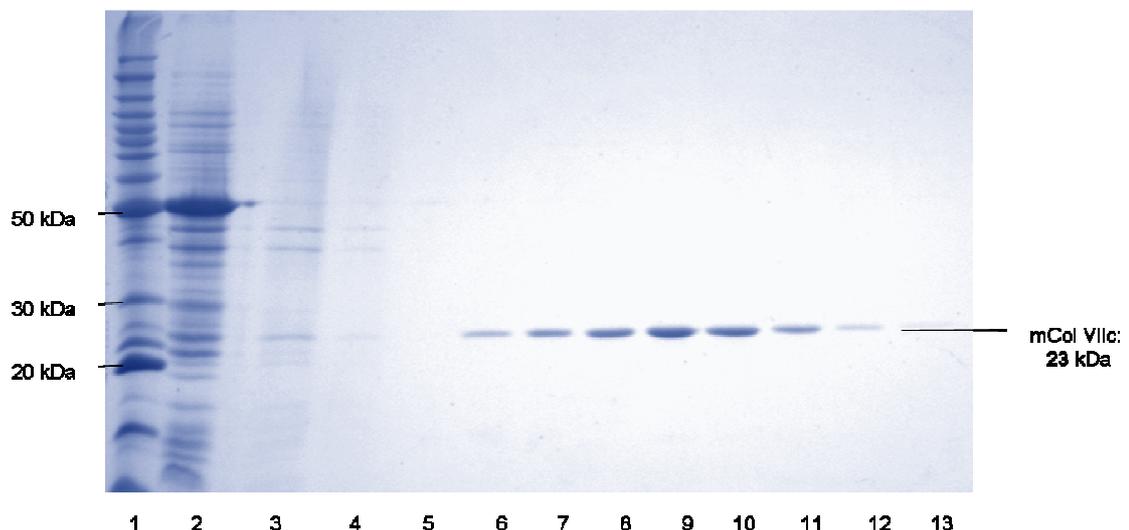
```

**Abb. 11. Abgleich der Sequenzierungsdaten.** Zunächst wurde mit Hilfe der Software vom *ExPASy Proteomics* der DNA-Code der sequenzierten Plasmidabschnitte in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Anschließend erfolgte mit dem Programm *Needle* des EBI-Servers der Abgleich mit der bekannten Aminosäuresequenz des mCol VIIc-Fragmentes.

Beide Fragmente hatten jeweils eine Länge von 210 Aminosäuren. Die verschiedenen Aminosäuren sind in der Abb. als Buchstaben kodiert. *C1-P1-01*: Aminosäuresequenz des sequenzierten Klons; *mCol7c*: Aminosäuresequenz des mCol VIIc-Fragmentes. Von dem Programm wurden die Parameter *Identity* (engl.: Gleichheit) und *Similarity* (engl.: Gemeinsamkeit) mit 100% angegeben und für den Parameter *Gaps* (engl.: Lücken) wurde ein Wert von 0,0 % ermittelt.

### Proteinexpression und Affinitätsaufreinigung des mCol VIIc-Proteins

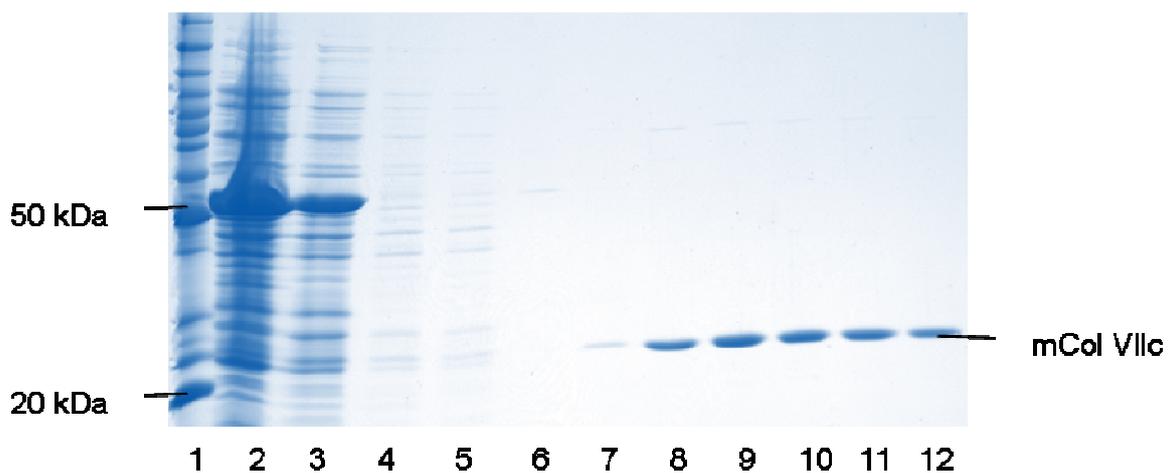
Nach der Sequenzierung der Plasmide sollte gezeigt werden, dass durch Induktion der Proteinexpression in Bakterien das C-Fragment des Kollagen Typ VII in nicht modifizierter Form aufgereinigt werden kann. Dazu wurde der rekombinante pTwin1-mCol VIIc-Vektor in chemisch kompetente Bakterien (*E.coli Rosetta blue*) transformiert. Diese Bakterien wurden in LB-Medium angezchtet und über Nacht inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von IPTG induziert. Nach Aufspaltung der Bakterien wurde das Lysat der Zellen über eine Chitinmatrix gepumpt und die Matrix anschließend mit einem Puffer eines definierten pH-Wertes (pH 6,5) gewaschen. Die verschlossene Chitinsäule wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Änderung des pH-Wertes und der Temperatur konnte eine Abspaltung des mCol VIIc-Proteins von der CBD induziert werden. Das mCol VIIc-Protein wurde in Fraktionen von je einem Milliliter aus der Chitinsäule eluiert und Proben dieser Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färbung der SDS-Gele mit Coomassie blau konnte eine Proteinbande entsprechend des berechneten Gewichtes des mCol VIIc –Proteins bei 23 kDa sichtbar gemacht werden (Abb. 12).



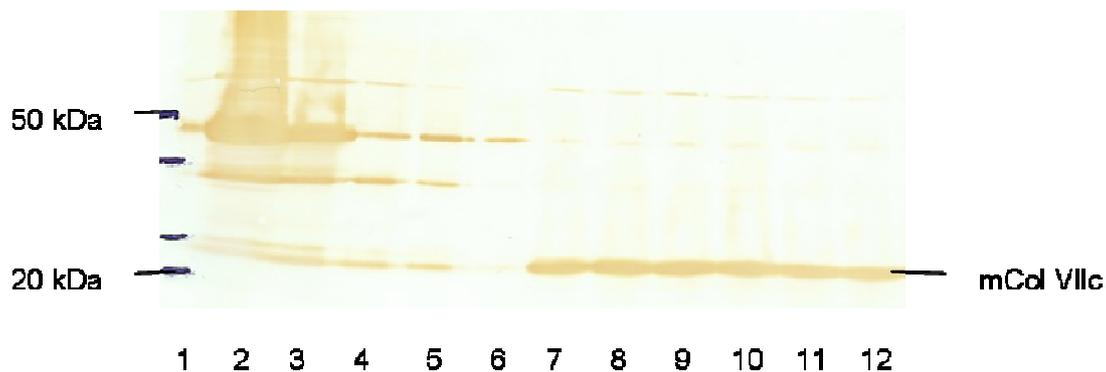
**Abb. 12. Analyse der Proteinexpression und der Affinitätsaufreinigung.** Auf ein SDS-Gel (Sammelgel: 5 % SDS, Trenngel: 12 % SDS) wurden Proben von verschiedenen Abschnitten der Proteinexpression und Aufreinigung aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Spur 1 = Molekulargewichtsmarker ( invitrogen ). 2 = Probe des Zelllysates, bevor es auf die chitinhaltige Matrix gegeben wurde. Deutlich sichtbar ist die Bande bei ca. 48 kDa, die dem Fusionsprotein entspricht. 3 = Probe des Zelllysates nach Passieren der Chitinsäule. 4 -5 = Proben verschiedener Waschpuffer. 6 -12= Proben der Fraktionen, die aus der Chitin Matrix eluiert wurde.

### Immunoblot mit Seren erkrankter Mäuse

Die Fähigkeit des aufgereinigten C-Fragments, Antikörper aus den Seren immunisierter Mäuse zu detektieren, sollte im Immunoblot überprüft werden. Dafür wurden Proben der verschiedenen Schritte der Affinitätsaufreinigung erneut auf ein SDS-Gel geladen und elektrophoretisch getrennt (Abb.13). Mittels Blotverfahren wurden die aufgetrennten Proteine im SDS-Gel anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde zunächst mit einem Blocking-Puffer und anschließend mit dem Serum einer immunisierten Maus inkubiert. Die Maus war im Zuge vorheriger Arbeiten mit GST-mCol VIIc immunisiert worden, so dass bei ihr Antikörper gegen mCol VIIc im Serum nachweisbar waren. Nach der Inkubation mit dem Mäuseserum wurde die Membran für eine Stunde mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und anschließend mit in Wasser gelöstem Diaminobenzidin entwickelt. Nach der Entwicklung zeigte sich eine deutliche Bande im reinen Lysat der Bakterien bei etwa 50 kDa (Abb.14). Dies entspricht dem Fusionsprotein aus Chitin-bindender Domäne und dem C-Fragment des Kollagen VII. In den von der Chitinsäule eluierten Fraktionen ist, gemäß der Größe des C-Fragmentes der NC-1 Domäne, eine kräftige Bande bei 23 kDa erkennbar.



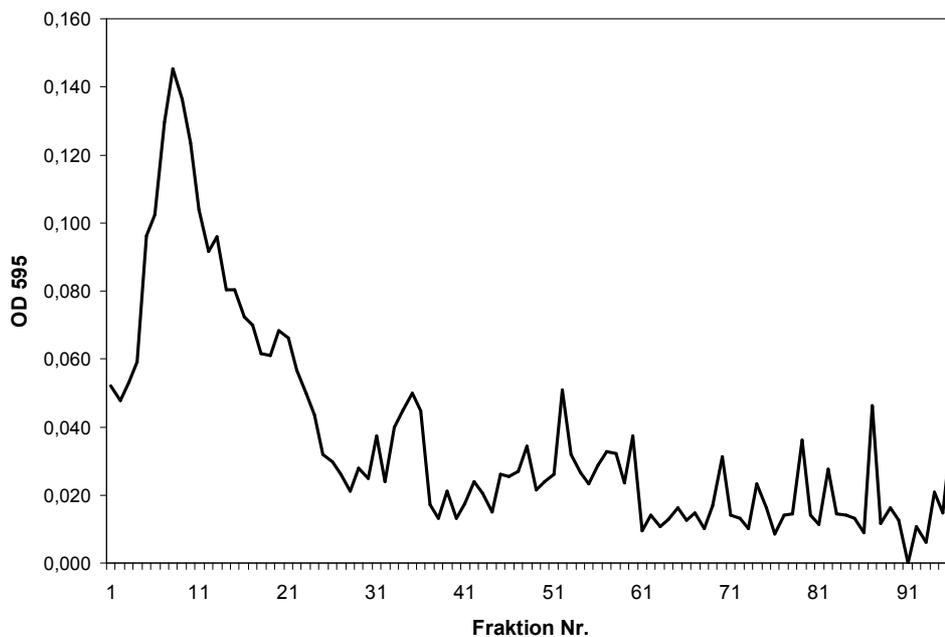
**Abb. 13. SDS-Gelelektrophorese.** Spur 1 = DNA-Marker ( invitrogen ). 2 = Lysat der Bakterienzellen, bevor es auf die chitinhaltige Matrix gegeben wurde. Das Fusionsprotein ist bei ca. 48 kDa deutlich erkennbar. 3 = Probe des Lysats, 1:10 verdünnt. 4 = Zellysate nach Durchfluss durch die Chitin-Säule. 4 -6 = Proben der verwendeten Waschpuffer. 7 -12= Proben eluierter Fraktionen. Das mCol VIIc-Protein migriert im SDS-Gel gemäß seiner Größe von 23 kDa und ist nach Färbung mit Coomassie blue deutlich erkennbar. Proteine, die in einem Duplikat dieses Gels aufgetrennt worden waren, wurden mittels Blot-Technik auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.



**Abb. 14. Immunoblot nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran.** Nach der Entwicklung der Membran sind deutliche Banden erkennbar. In dem Lysat der Bakterienzellen und in einer 1:10-Verdünnung des Lysats sind kräftige Banden bei ca. 50 kDa erkennbar (Spur 2, 3). Diese entsprechen dem Fusionsprotein von 48 kDa. Wesentlich schwächere Banden sind auch im Durchfluss der Chitinsäule (4) und in Proben der verwendeten Waschpuffer vorhanden (5,6). Diese Banden legen nahe, dass initial nicht die gesamte Menge des Fusionsproteins an der Chitinsäule binden konnte bzw. bei den einzelnen Waschsritten bereits kleinere Mengen Protein von der Säule gelöst wurden. In den Spuren sieben bis zwölf sind starke Banden im Bereich von 23 kDa erkennbar, entsprechend der Größe des C-Fragmentes der NC1-Domäne

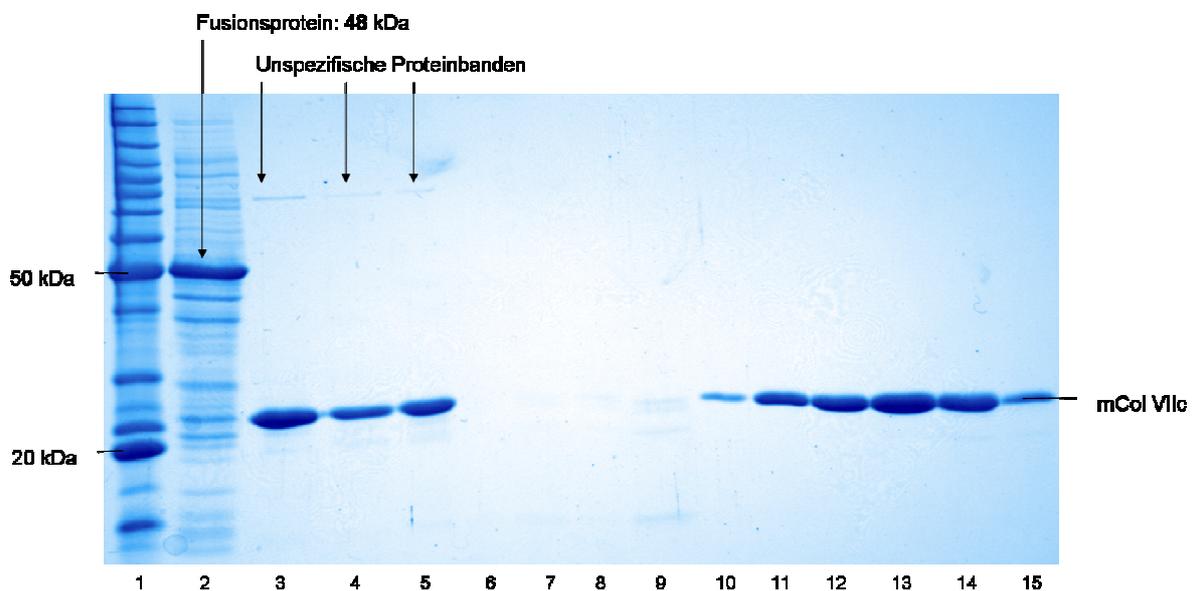
### Analyse der Anionenaustauschchromatographie

Im Anschluss an die Affinitätsaufreinigung des C-Fragmentes zeigten sich neben der gewünschten Bande bei 23 kDa weitere Verunreinigungen durch andere Proteine (Abb.16). Um diese zu entfernen, wurde ein zweiter Reinigungsschritt benötigt. Für diesen zweiten Reinigungsschritt eignet sich die Anionenaustauschchromatographie aufgrund ihrer einfachen Durchführbarkeit, der geringen Verluste an eingesetztem Protein sowie eines Reinigungsfaktors von 10 bis 20. Nach der Durchführung der Anionenaustauschchromatographie wurde der Proteingehalt der einzelnen Fraktion mittels Bradford-Assay bestimmt und mit Hilfe der SDS-Page überprüft (Abb.15). An Hand des mit Coomassie blue gefärbten SDS-Gel sieht man deutlich, dass Verunreinigungen entfernt werden konnten und das C-Fragment der NC1-Domäne mit einem hohen Reinheitsgrad aufgereinigt wurde (Abb.16).



**Abb. 15. Analyse der Fraktionen nach Ionenaustauschchromatographie (IAChr).**

Darstellung der gemessenen Extinktionswerte der eluierten Fraktionen nach IAChr. Von jeder einzelnen Fraktion wurden 20  $\mu\text{l}$  in eine Kammer einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pipetiert und 80  $\mu\text{l}$  einer Protein Assay-Lösung hinzu gegeben. Die folgende Farbreaktion wurde mit 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gestoppt und die Extinktion gemessen. Höhere Extinktionswerte sprechen für einen erhöhten Proteingehalt der Probe. OD 595 = Extinktion bei 595 nm Wellenlänge.



**Abb. 16. Analyse der Fraktionen nach Ionenaustauschchromatographie durch SDS-PAGE.**

Protein enthaltende Fraktionen wurden nach der IAChr. auf ein SDS-Gel geladen.

*Spur 1:* Molekulargewichtsmaker (*invitrogen*). *Spur 2:* Zelllysate vor Affinitätsaufreinigung an der Chitin-Matrix. *Spur 3:* Aus der Chitin-Matrix eluiertes Protein nach Affinitätsaufreinigung. Deutlich sind die Verschmutzungen durch andere Proteine als Banden größeren Molekulargewichts zu erkennen.

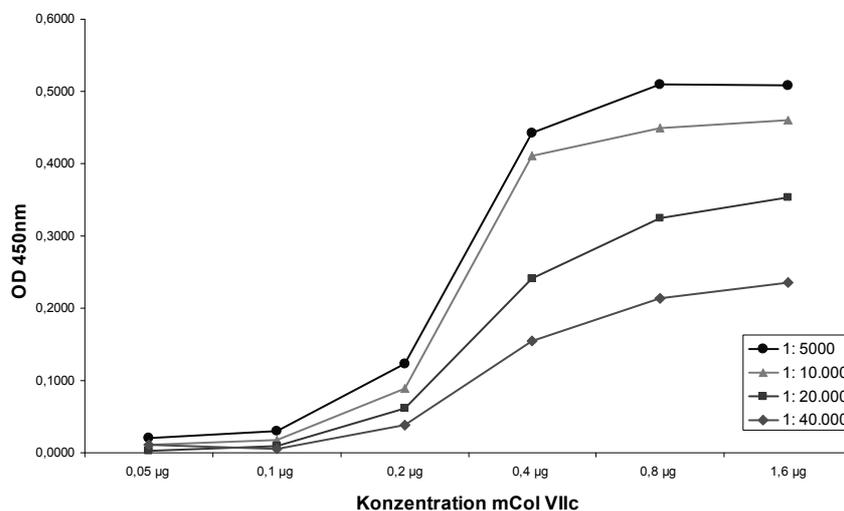
*Spur 4 - 5:* Umgepufferte Proteinlösung vor Durchführung der IAChr.

*Spur 6 - 15:* Proben der 3. bis 12. Fraktion, die aus der Ionenaustauschsäule eluiert worden waren (s. Abb. 18).

Nach der Anionenaustauschchromatographie wurden die Fraktionen, in denen das mCol VIIc- Protein mittels Bradford-Assay und SDS-Analyse nachgewiesen worden war, in eine PBS-Pufferlösung überführt und weiter aufkonzentriert. Ausgehend von den Proteinparametern, die von der ExPASy Proteomics Datenbank übernommen worden waren, wurde die Konzentration des mCol VIIc- Proteins photometrisch bestimmt.

### Optimierung der mCol VIIc-ELISA Parameter

Um die optimalen Bedingungen für den mCol VIIc -ELISA zu ermitteln, wurde ein Titrationsverfahren angewendet. Hierfür wurde eine Mikrotiterplatte mit dem mCol VIIc-Protein in verschiedenen Konzentrationen beladen. Das Serum einer nachweislich erkrankten Maus wurde als Standardserum verwendet und in verschiedenen Verdünnungen aufgetragen. Nach Inkubation mit einem HRP-gekoppelten, anti-Maus IgG Sekundärantikörper wurde der ELISA entwickelt und die Extinktion der Farbreaktion gemessen. Die Extinktionswerte der einzelnen Verdünnungsreihen wurden gegen die Konzentration des mCol VIIc aufgetragen (Abb. 17).



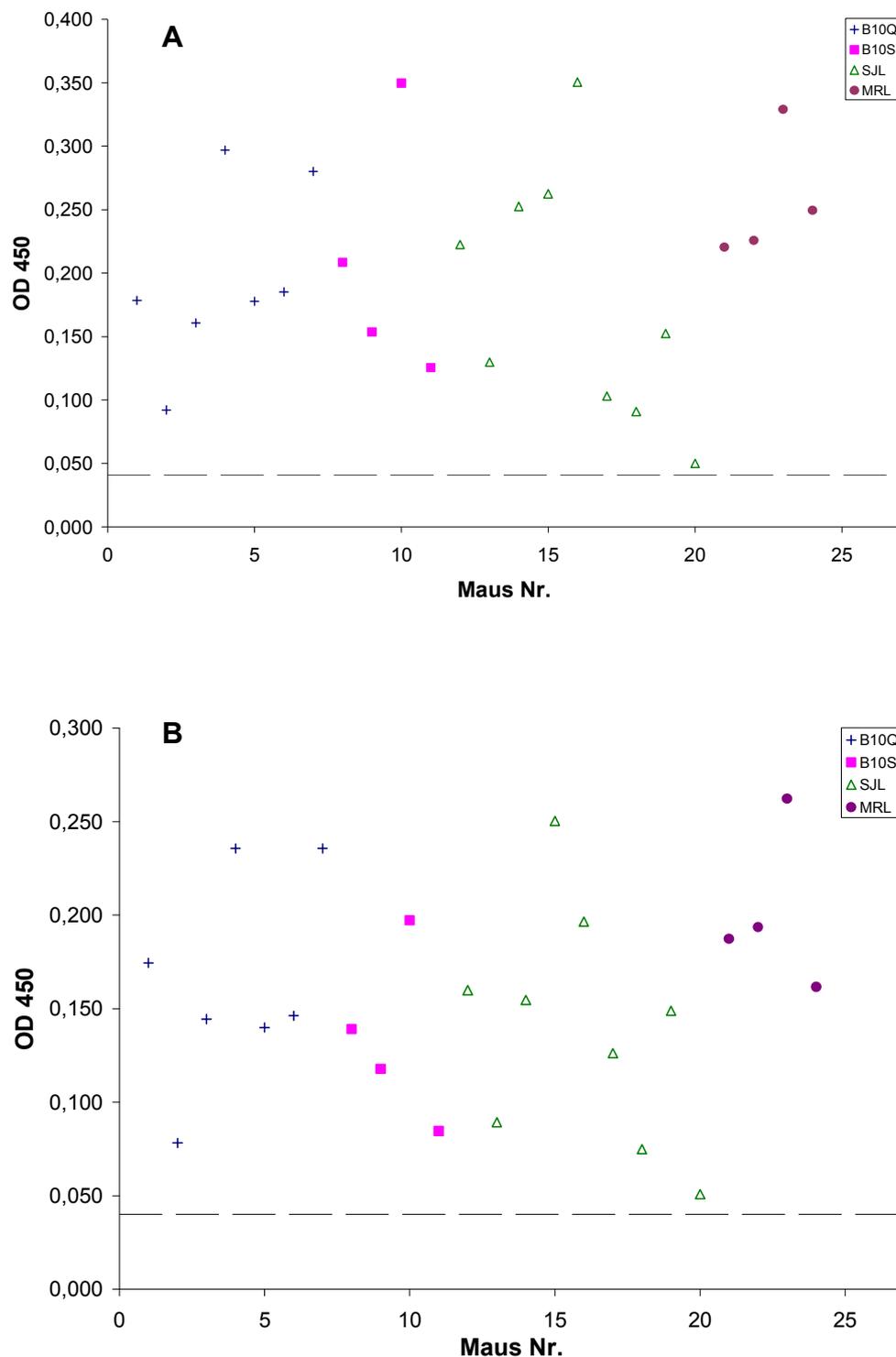
**Abb.17. Titration mit Verdünnungsreihen des mCol VIIc-Proteins und eines Mäuseserums.** OD 450= optische Dichte bei 450 nm Wellenlänge. Konzentration mCol VIIc in µg pro Loch. Verdünnung des Mäuseserums von 1:500 bis 1:40000.

Anhand der graphischen Darstellung der gemessenen Extinktionswerte bei verschiedenen Proteinkonzentrationen und unterschiedlichen Verdünnungen des Mäuseserums wurde für den ELISA ein Optimum zur Detektierung von Antikörpern bei einer Proteinkonzentration zwischen 0,2 µg und 0,8 µg Protein pro Loch ermittelt. Für die zu untersuchenden Mäuseseren wurde eine Verdünnung von 1:20.000 gewählt.

## Messungen von Mäuseseren mittels mCol VIIc- und GST-mColVIIc ELISA

Mit Seren von Mäusen, die zuvor mit einem rekombinanten GST-mCol VIIc immunisiert worden waren, sollte die Fähigkeit des aufgereinigten C-Fragmentes der NC1-Domäne zur Detektierung von Autoantikörpern im ELISA getestet werden. Um die Aussagekraft zu vergleichen, wurden die Seren der Mäuse zusätzlich mit einem etablierten ELISA-Verfahren gemessen, das im Zuge früherer Arbeiten zum aktiven Mausmodell der EBA entwickelt worden war (90). Bei dieser etablierten Methode wird GST-mCol VIIc als Antigen verwendet, wobei zunächst die Extinktion eines zu untersuchenden Serums gegenüber GST-mCol VIIc gemessen wird. Anschließend erfolgt die Messung gegenüber reinem GST. Der Messwert des GST wird dann vom Wert des GST-mCol VIIc subtrahiert, um die alleinige Reaktivität gegen das C-Fragment der NC1-Domäne des Kollagen Typ VII zu bestimmen.

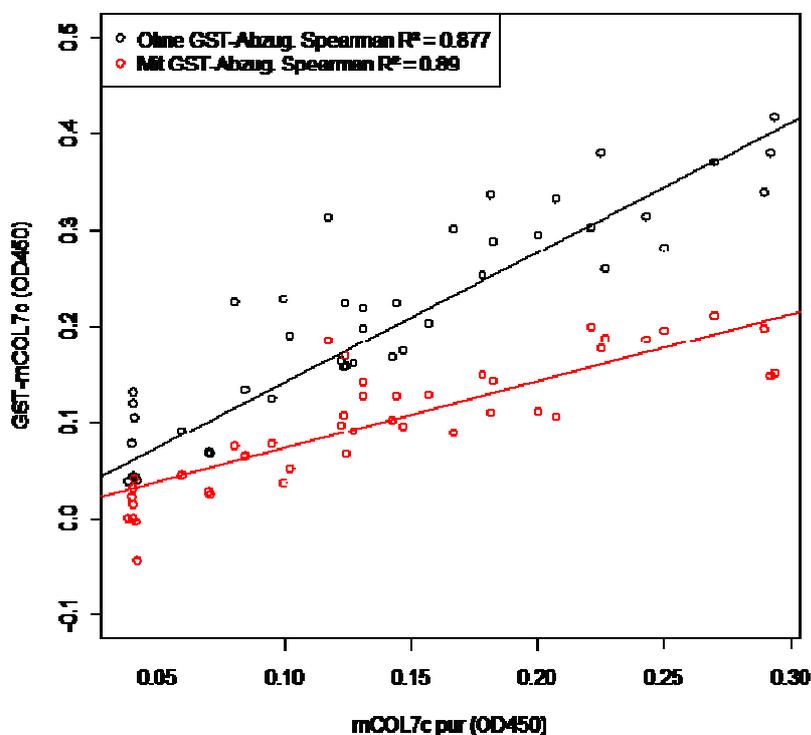
Für die Durchführung der Messungen wurden Mäuseseren verschiedener Mausstämme verwendet: SJL ( $n = 9$ ), B10Q ( $n = 7$ ), B10S ( $n = 4$ ) und MRL ( $n = 4$ ). Als Kontrollen dienten Seren nicht-immunisierter Mäuse ( $n=3$ ). Die Festlegung des Schwellenwertes, ab dem eine gemessene Extinktion als positiv für das Vorhandensein von Autoantikörpern angesehen wurde, erfolgte getrennt für die beiden ELISA-Systeme. Hierbei wurde nach einer beschriebenen Methode verfahren (72). Aus den Extinktionswerten von Messungen nicht-immunisierter Mäuse ( $n=3$ ) wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung vom Mittelwert berechnet. Als Schwellenwert wurde der Mittelwert der Messung zuzüglich des Dreifachen der Standardabweichung angenommen. Bei der grafischen Darstellung der Messwerte beider ELISA-Systeme und des jeweiligen Schwellenwertes zeigt sich, dass der mCol VIIc- ELISA ebenso wie der etablierte GST-mCol VIIc ELISA in allen untersuchten Seren Antikörper detektiert (Abb.18).



**Abb. 18. Ermittlung des Schwellenwertes als Einschlusskriterium für die Bestimmung von Antikörpern mittels GST-mColVIIc- und mCol VIIc-ELISA.** In allen untersuchten Mäuseseren konnten Antikörper, die gegen das C-Fragment der NC1-Domäne des Kollagen Typ VII gerichtet sind, nachgewiesen werden. **A:** Messwerte des GST-mCol VIIc-ELISA. Der ermittelte Schwellenwert ist als durchgehende Linie eingezeichnet ( $OD\ 450: 0,042$ ).

**B:** Messwerte des mCol VIIc-ELISA. Der Schellenwert ist als durchgehende Linie eingezeichnet ( $OD\ 450: 0,040$ ). *B10Q*, *B10S*, *SJL*, *MRL* = Stämme der untersuchten Mäuse. OD 450 = Optische Dichte, gemessen bei 450 nm.

Um festzustellen, ob zwischen den Messwerten des GST-mCol VIIc- ELISA und des mCol VIIc-ELISA eine Korrelation besteht, wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman ( $r$ ) und das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) berechnet (Abb.19). Um den Einfluss der Subtraktion der GST-Messwerte von den GST-mCol VIIc-Messwerten in der etablierten ELISA-Methode zu bestimmen, wurden Korrelationskoeffizient und Bestimmtheitsmaß vor und nach Abzug des GST-Wertes ermittelt. Der Korrelationskoeffizient zwischen den Messdaten des mCol VIIc-ELISA und dem GST-mCol VIIc -ELISA beträgt 0,93 ( $R^2 = 0,87$ ) vor der Subtraktion und erhöht sich auf 0,94 ( $R^2 = 0,89$ ) nach Abzug der GST-Werte.



**Abb.19. Darstellung der Extinktionswerte, die mit reinem mCol VIIc und mit GST-mCol VIIc als Antigen im ELISA gemessen wurden.**

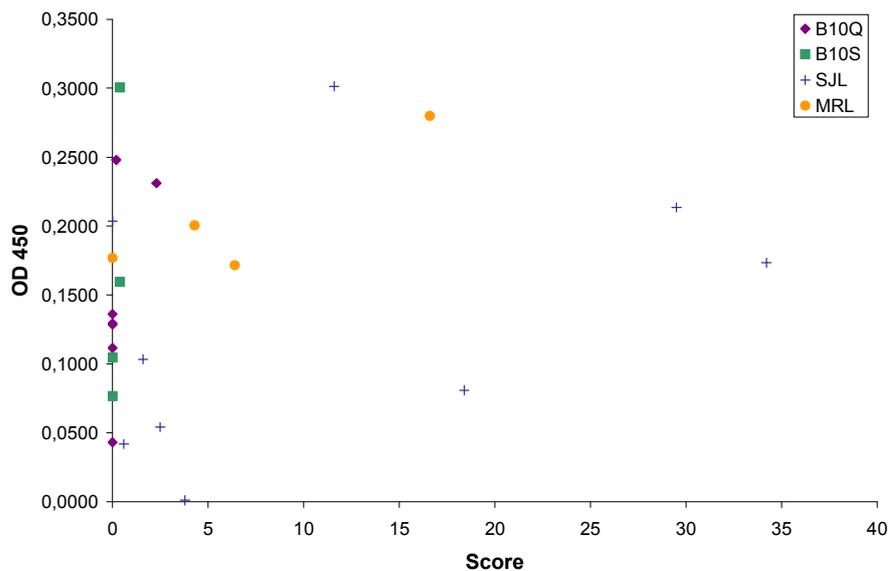
Eingezeichnet sind die Trendlinien in linearer Darstellung für die Messwerte des GST-mCol VIIc-ELISA vor und nach Abzug des Extinktionswertes des GST.

OD 450 = Extinktion, gemessen bei 450 nm Wellenlänge.

## Korrelation von klinischem Erscheinungsbild und zirkulierenden Antikörpern

Um die Aussagekraft des mCol VIIc-ELISA mit der des GST-mCol VIIc-ELISAs zu vergleichen und um festzustellen, ob zwischen den Autoantikörpern im Serum und dem Auftreten von Hauterscheinungen in erkrankten Mäusen eine Korrelation besteht, wurden die Extinktionswerte gegen den klinischen Score der Mäuse aufgetragen und der Spearman-Korrelationskoeffizient ( $r$ ) berechnet (Abb.20 und 21). Für

diese Untersuchung wurde ein anti-muriner, polyklonaler Antikörper als Sekundäranantikörper verwendet, der im ELISA gebundene IgG-Autoantikörper aus den Mäuseseren unabhängig von der IgG-Subklasse detektiert. Der jeweils gemessene Extinktionswert ist somit ein Wert für die Gesamt-Immunglobuline der Klasse G im Serum der Maus, die gegen das C-Fragment des Kollagen Typ VII gerichtet sind.



**Abb.20. Klinischer Score der immunisierten Mäuse und mittels mCol VIIC-ELISA gemessene Extinktionswerte.**

Messwerte der verschiedenen Mausstämmen:

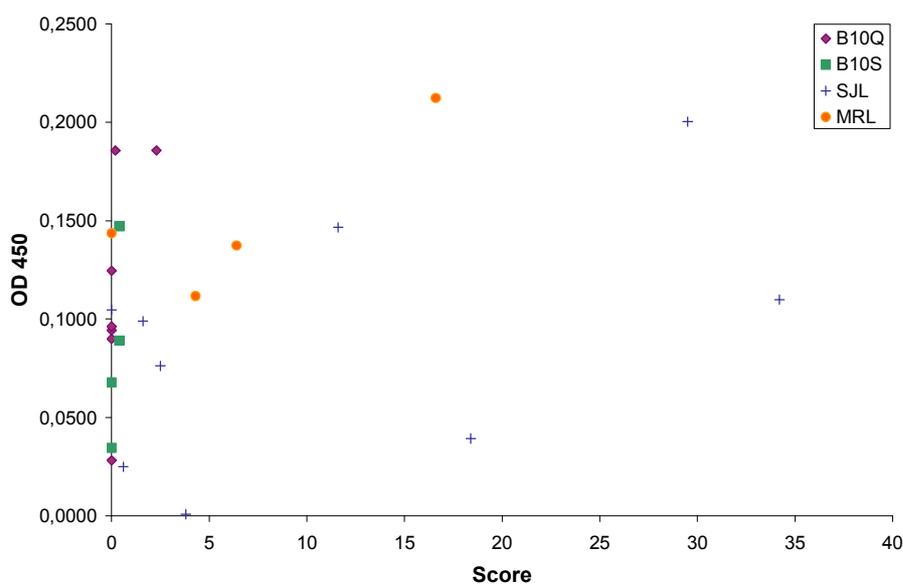
B10Q ( $n=7$ ),

B10S ( $n=4$ ),

MRL ( $n=4$ ),

SJL ( $n=9$ ).

OD 450 = Extinktion, gemessen bei 450 nm Wellenlänge.



**Abb.21. Klinischer Score der immunisierten Mäuse und mittels GST-mCol VIIC-ELISA gemessene Extinktionswerte.**

Messwerte der verschiedenen Mausstämmen:

B10Q ( $n=7$ ),

B10S ( $n=4$ ),

MRL ( $n=4$ ),

SJL ( $n=9$ ).

OD 450 = Extinktion, gemessen bei 450 nm Wellenlänge.

Der Spearman-Korrelationskoeffizient für die Extinktionswerte, die mit Hilfe des GST-mCol VIIC-ELISA gemessen worden waren, und dem klinischen Score der unter-

suchten Tiere ( $n = 24$ ) betrug  $r = 0,3$ . Für die Messwerte des mCol VIIc-ELISA und dem Score der Mäuse wurde ein Korrelationskoeffizient von  $r = 0,25$  berechnet.

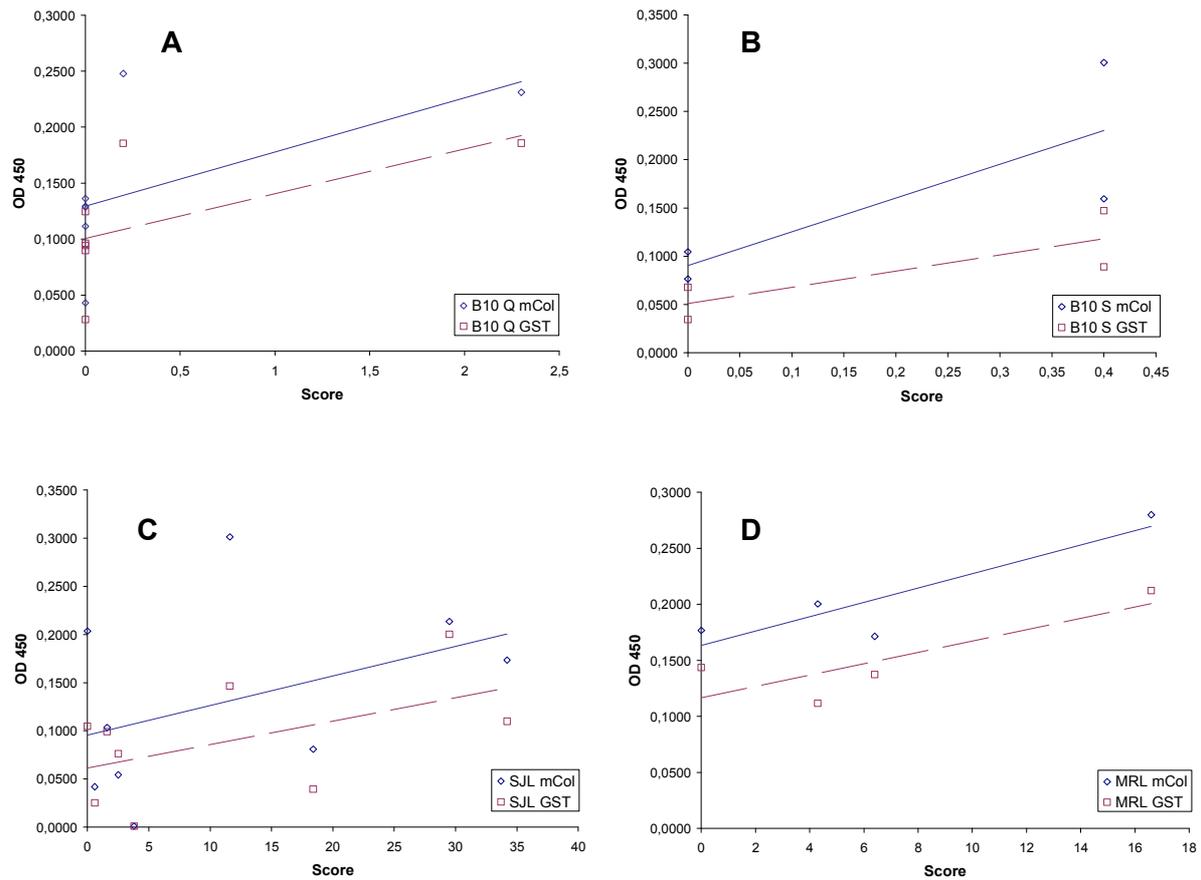
### Bestimmung der Korrelation in verschiedenen Mäusestämmen

Die Korrelation zwischen den IgG Autoantikörpern und dem klinischen Score der Mäuse wurde für die verschiedenen Mausstämmen separat untersucht. Hierfür wurde für jeden Mäusestamm der Spearman-Korrelationskoeffizient ( $r$ ) für die Beziehung zwischen dem klinischen Score der Tiere und den Extinktionswerte ermittelt (Tab. 3)

Stamm	n	Klinisch erkrankt	Serum-antikörper	mCol VIIc ELISA $r$	GST-mCol VIIc ELISA $r$
B10 Q	7	2 / 7	7 / 7	0,59	0,61
B10 S	4	2 / 4	4 / 4	0,81	0,82
SJL	9	8 / 9	9 / 9	0,41	0,51
MRL	4	3 / 4	4 / 4	0,90	0,83

**Tab.3. Übersicht Mausdaten.** Für die Mäuse der Stämme B10Q, B10S, SJL und MRL wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient ( $r$ ) berechnet. Der Wert wurde ausgehend von den ELISA-Messdaten bestimmt, die mit den beiden verschiedenen Antigenen *mCol VIIc* und *GST-mCol VIIc* ermittelt worden waren. Der Anteil der klinisch sichtbar erkrankten Mäuse war, je nach Stamm, unterschiedlich. Antikörper gegen das C-Fragment der NC1-Domäne des Kollagen Typ VII ließen sich aber unabhängig vom Stamm im Serum jedes untersuchten Tieres nachweisen.

Beim Vergleich der Korrelationskoeffizienten, die für die einzelnen Mausstämmen jeweils basierend auf den GST-mCol VIIc- und mCol VIIc-ELISA Messdaten berechnet wurden, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p < 0,01$ ). In der graphischen Darstellung der gemessenen Extinktionswerte, aufgetragen gegen den klinischen Score der Tiere, ist deutlich erkennbar, dass die Korrelation zwischen diesen beiden Parametern in den verschiedenen Mausstämmen unterschiedlich hoch ist (Abb.24).



**Abb. 22. Korrelation zwischen klinischem Score und gemessenen Extinktionswerten in verschiedenen Mausstämmen.** Die Extinktionswerte wurde mittels GST-mCol VIIc- und mCol VIIc-ELISA gemessen. Für die verschiedenen Mausstämmen B10 Q (**A**), B10 S (**B**), SJL (**C**) und MRL (**D**) sind die jeweiligen Trendlinien eingezeichnet. Auf der Abszisse ist der klinische Score aufgetragen.

OD 450: Extinktion, gemessen bei 450 nm Wellenlänge.

## Diskussion

### Etablierung von Tiermodellen der EBA

Die EBA ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Haut und der Schleimhäute, die durch Bildung von subepidermalen Blasen und Antikörpern gegen Kollagen Typ VII charakterisiert ist (91).

Zur genaueren Untersuchung der Pathogenitätsfaktoren der EBA und der auslösenden Ursachen wurden verschiedene Krankheitsmodelle entwickelt. In einem modifizierten *ex vivo* Modell, das ursprünglich für Untersuchungen zur Glomerulonephritis entwickelt worden war, konnte mit Hilfe von Gefrierschnitten menschlicher Haut und Seren erkrankter Patienten die Antikörper vermittelte Rekrutierung von Leukozyten und die Induktion einer subepidermalen Spaltbildung demonstriert werden (42, 92, 110). Ein Nachteil dieses *ex vivo* Modells, bei dem die Gefrierschnitte nach der Inkubation mit Patientenseren mit Leukozyten gesunder Spender inkubiert werden, ist jedoch die fehlende Darstellung der Immunantwort gegenüber Kollagen Typ VII und der Granulozyteninfiltration in die menschliche Haut (89).

Ein weiteres Krankheitsmodell der EBA stellt das so genannte passive Mausmodell dar (45). In diesem Modell werden Kaninchenantikörper, die gegen das Kollagen VII gerichtet sind, in Mäuse injiziert. Dieser passive Transfer von Antikörpern führt in den Mäusen zur Entstehung von Blasen und zur Ablagerung von IgG und Komplementfaktor C3b in der DEJ (93, 108). Nach dem Verfahren, das auf dem Prinzip des passivem Transfers antigenspezifischer Antikörper aus mit murinen Antigenen immunisierten Kaninchen beruhte, konnten bereits für andere Blasen bildende Autoimmunerkrankungen wie z.B. das bullöse Pemphigoid, den Pemphigus vulgaris oder das Anti-Laminin 332 Schleimhautpemphigoid erfolgreich Tiermodelle entwickelt werden (58, 64, 68). 2006 gelang es Woodley et al., durch die Injektion von menschlichen anti-Kollagen-Typ VII-Antikörpern eine EBA-ähnliche Erkrankung in Mäusen zu erzeugen. Hierfür musste allerdings eine vergleichsweise hohe Dosis an aufgereinigten Autoantikörpern eingesetzt werden (109).

Sitaru et al. entwickelten zudem ein aktives Mausmodell der EBA durch aktive Immunisierung von Mäusen verschiedener Stämme mit Fragmenten der NC1 Domäne von murinem Typ VII Kollagen. (90). Zu den Vorteilen dieses aktiven Modells zählt die Darstellung der Immunantwort gegen Kollagen Typ VII und der Blasen bildende Pro-

zess *in vivo*. Für die Immunisierung der Mäuse und für weitere Untersuchungen im Zuge des Mausmodells war ein rekombinantes Fragment der NC1-Domäne hergestellt worden, da Autoantikörper von EBA-Patienten hauptsächlich Epitope auf der NC1-Domäne des Kollagen Typ VII erkennen und nur sehr wenige Seren zusätzlich mit der NC2-Domäne reagieren (32, 57, 90, 107).

### **Konstruktion und Aufreinigung eines nicht-modifizierten C-Fragmentes der NC1 Domäne von Kollagen Typ VII**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein nicht-modifiziertes C-Fragment der NC1-Domäne in Bakterien zu exprimieren und mit Hilfe dieses Proteins einen ELISA zu entwickeln, der mit dem bereits vorhandenen ELISA, basierend auf einem rekombinanten GST-gekoppelten C-Fragment, verglichen werden sollte. Für die Expression des C-Fragmentes wurde der pTwin1-Vektor gewählt, mit dem Proteine in nicht modifizierter Form aufgereinigt werden können (21, 44). Die 630 bp große DNA-Sequenz, die für das C-Fragment kodiert, konnte mittels PCR amplifiziert und nach einem Restriktionsverdau erfolgreich in den Vektor integriert werden, wie die Ergebnisse der Kolonie-PCR und des Kontrollverdaues verdeutlichen. Die Daten der Sequenzierungsanalyse des so hergestellten rekombinanten Vektors belegen, dass die integrierte DNA-Sequenz für das 210 Aminosäuren große C-Fragment des murinen Kollagen Typ VII kodiert. Nach dem Transfer des rekombinanten Vektors in Bakterienzellen und Induktion der Proteinexpression konnte das C-Fragment mit Hilfe einer Chitin-Matrix aufgereinigt werden. Trotz dieser Affinitätsaufreinigung wurden jedoch Verunreinigungen in Form anderer Proteine bei der Kontrolle der Proteinexpression festgestellt. Mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie konnte diese Kontamination weitestgehend eliminiert werden, so dass das mCol VIIc-Protein nach Abschluss aller Aufreinigungsschritte in reiner Form für die weiteren Untersuchungen im ELISA zur Verfügung stand.

### **Das nicht-modifizierte C-Fragment detektiert Anti-Kollagen Typ VII Antikörper**

Um zu überprüfen, ob das aufgereinigte C-Fragment für die Detektierung von Antikörpern aus den Seren immunisierter Mäuse verwendet werden kann, wurde das Protein zunächst im Immunoblot getestet. Auch Autoantikörper aus den Seren von

EBA-Patienten reagieren mit bestimmten Epitopen der humanen NC1- und NC2-Domäne, wenn sie im Immunoblot untersucht werden (46, 47). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Antikörper aus dem Serum erkrankter Mäuse mit dem exprimierten 23 kDA-großen Protein reagieren und dass es somit als Antigen im ELISA verwendet werden kann. Die optimalen Bedingungen für den mCol VIIc-ELISA wurden mit Hilfe eines Titrationsverfahrens ermittelt. Hierbei wurde nach einer etablierten Methode verfahren, mit der bereits für andere Blasen bildende Hauterkrankungen die ELISA-Bedingungen optimiert worden waren (22, 51, 114).

### **Die Verwendung eines nicht-modifizierten Antigens vereinfacht Messungen im ELISA**

Der neu entwickelte ELISA wurde mit der bisher verwendeten Methode verglichen, bei der GST-mCol VIIc als Antigen verwendet wird. Die Hauptschwierigkeit bei dem etablierten GST-ELISA-Verfahren besteht darin, dass mit dieser Methode die Reaktivität der Autoantikörper gegen mCol VIIc nicht direkt von der Reaktivität der für die Erkrankung unbedeutenden Antikörper gegen GST getrennt werden kann. Es ist erforderlich, zusätzlich die Reaktivität im zu untersuchenden Serum gegen GST alleine zu bestimmen, um diese dann für den Abgleich zu verwenden. Allerdings ist der einfache Abzug des ELISA-Signals, das für das GST allein ermittelt wurde, von dem gemessenen GST-mCol VIIc-Signal methodisch inkorrekt, da das ELISA-Signal nur in einem kleinen Messbereich eine lineare Charakteristik hat. Zudem ist es nicht möglich, zwei ELISA-Ergebnisse direkt miteinander zu vergleichen. Dieses geht nur über einen passenden Standard. Um den Anteil der spezifischen Reaktivität gegen mCol VIIc zu bestimmen, ist es erforderlich, die Signale anhand von Mäuseseren zu normalisieren, die nur mit GST immunisiert wurden. Im Vergleich dazu bestimmt der neu entwickelte ELISA nicht die Reaktivität gegen GST, sondern ausschließlich die Reaktivität der Antikörper, die gegen das C-Fragment gerichtet sind. Dadurch wird die ELISA-Methode wesentlich vereinfacht und reproduzierbarer.

Da durch die Verwendung eines nicht-modifizierten Antigens die Anzahl der notwendigen Messungen für die Untersuchung eines Serums halbiert wird, kann durch den mCol VIIc-ELISA der Verbrauch an Material und Seren um die Hälfte reduziert werden. Außerdem ist es für die neu entwickelte ELISA-Methode nicht mehr erforderlich,

weitere Mäuse mit reinem GST zu immunisieren, um Standardseren für die Messungen im ELISA zu gewinnen.

### **Die Aussagekraft des neuen mCol VIIc-ELISA unterscheidet sich nicht signifikant vom GST-mCol VIIc-ELISA**

Um der Frage nachzugehen, ob sich der neu entwickelte ELISA gegenüber dem etablierten GST-basierten Verfahren hinsichtlich der Aussagekraft unterscheidet, wurde die Korrelation zwischen dem klinischen Erscheinungsbild und der Höhe zirkulierender Autoantikörper im Serum erkrankter Mäuse untersucht.

Für die EBA ist bekannt, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und der Höhe der Antikörpertiter im Serum erkrankter Patienten besteht (14, 59). Für andere Autoimmunerkrankungen der Haut, wie etwa dem bullösen Pemphigoid, wurde ebenfalls der Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und dem Auftreten von Autoantikörpern untersucht.

Beim bullösen Pemphigoid (BP) handelt es sich um die häufigste Blasen bildende Autoimmunerkrankung der Haut. Das BP ist durch eine subepidermale Blasenbildung und Autoantikörper gegen die beiden hemidesmosomalen Strukturproteine Kollagen Typ XVII und BP230 charakterisiert (37, 70, 86). Bei Patienten mit bullösem Pemphigoid wurde eine Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und den Serumspiegeln der Anti-BP180 Antikörper nachgewiesen (85, 102). Diese Erkenntnis konnte in einem passiven Tiermodell, bei dem Antikörper von zuvor gegen Kollagen XVII immunisierten Kaninchen in neonatale BALB/c Mäusen transferiert wurden und dort eine subepidermale Blasenbildung auslösten, bestätigt werden (61, 64).

Für die EBA konnte sowohl im passiven als auch im aktiven Mausmodell eine Korrelation zwischen dem klinischen Erscheinungsbild der Mäuse und den Ablagerungen von Immunglobulinen an der DEJ festgestellt werden (90, 93). Vergleicht man die Korrelationskoeffizienten zwischen dem klinischen Score der untersuchten Tiere und den gemessenen Antikörpertitern, die anhand der Messwerte des mCol VIIc- bzw. GST-mCol VIIc-ELISA berechnet wurden, so findet man in beiden Fällen eine hohe Übereinstimmung. Trotz der Verwendung eines spezifischen, nicht modifizierten Antigens im mCol VIIc-ELISA besteht jedoch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Korrelation zwischen den Antikörpertitern und der Schwere der Krankheit im Vergleich zu dem etablierten ELISA-Verfahren. Dies spricht dafür, dass die Hauptinfor-

mation, die der ELISA im aktiven Mausmodell liefert, vor allem dem Nachweis einer erfolgreichen Immunisierung der Mäuse dient. Eine höhere Aussagekraft bezüglich der Korrelation zwischen dem klinischen Erscheinungsbild und dem Auftreten von Antikörpern gegen Bestandteile der DEJ scheinen andere Methoden wie z.B. die direkte Immunfluoreszenzmikroskopie zu haben (90, 93). Zudem wurde in dem neu etablierten ELISA die Reaktivität gegen alle IgG Subklassen gleichermaßen erfasst. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass die Pathogenität im aktiven Mausmodell der EBA durch die komplementaktivierenden Immunglobuline der Subklassen 2a und 2b vermittelt wird (89). Weitere Untersuchungen unter Verwendung von IgG2a- und IgG2b-spezifischen Sekundärantikörpern sind geplant. Eine weitere Erklärung für das Ausmaß der Korrelation wäre auch, dass nicht alle gegen das rekombinante C-Fragment gerichteten Antikörper auch pathogene Eigenschaften *in vivo* haben. So reicht das alleinige Auftreten von gewebsgebundenen oder im Serum zirkulierenden Autoantikörpern gegen Kollagen Typ VII nicht aus, um das Krankheitsbild der EBA in Mäusen zu induzieren (90). Ein ähnliches Phänomen konnte auch in Tiermodellen anderer Autoimmunerkrankungen beobachtet werden. Hier zeigte sich, dass in Mäusen, denen entweder passiv spezifische Antikörper injiziert worden waren oder die man gegen ein bestimmtes Antigen immunisierte, trotz des Nachweises von IgG-Antikörpern kein klinisches Bild der jeweiligen Erkrankung auftrat (36, 65, 103).

### **Das Ausmaß der Hautläsionen in immunisierten Mäusen ist abhängig vom jeweiligen Stamm**

In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl mit dem etablierten GST-mCol VIIc ELISA als auch mit dem spezifischen mCol VIIc-ELISA in allen untersuchten Seren immunisierter Mäuse Antikörper gegen das C-Fragment nachgewiesen werden. Allerdings zeigten nur 63 % der untersuchten Tiere klinische Merkmale einer EBA. Hierbei lag der Anteil der erkrankten Tiere an allen immunisierten Mäusen in der Gruppe der SJL-Mäuse mit 89 % am höchsten, was den Ergebnissen vorheriger Untersuchungen im aktiven Mausmodell entspricht (90).

Als Ursache für die unterschiedliche Induzierbarkeit der Krankheit in verschiedenen Mausstämmen wird der genetische Hintergrund der Tiere angenommen. In der Tat konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Suszeptibilität zur Ausbildung einer EBA in Mäusen nach Immunisierung mit dem C-Fragment der NC1 Domäne von Kollagen

Typ VII durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, Major Histocompatibility Complex) H2s vermittelt wird (79). Dass die Induktion einer Erkrankung durch Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten Proteinen vom jeweils verwendeten Mäusestamm abhängt, wurde auch bei der Etablierung eines Tiermodells der Autoimmunerkrankung Myasthenia gravis und des Goodpasture Syndroms beobachtet (48, 49).

### **Ausblick**

Die Etablierung eines aktiven Tiermodells durch die Immunisierung von Mäusen konnte neue Hinweise und Erkenntnisse über die immunologischen Vorgänge bei der Entstehung der EBA liefern. Der für die Messungen im Mausmodell verwendete ELISA konnte im Rahmen dieser Arbeit vereinfacht und effizienter gestaltet werden, was zukünftige Untersuchungen im aktiven Tiermodell der EBA erleichtern soll. Das für die vorliegende Arbeit konstruierte und exprimierte C-Fragment vereinfacht aber nicht nur den ELISA oder Immunoblot, sondern kann auch für weitere immunologische Methoden im Rahmen der Erforschung der Krankheitsmechanismen der EBA verwendet werden. So können durch Kopplung des C-Fragmentes an eine Sepharose-Matrix Antikörper aus den Seren immunisierter Mäuse aufgereinigt und für weitere Untersuchungen aufbereitet werden. Durch die Verwendung eines Phagen-Displays können mit Hilfe des hergestellten Proteins rekombinante Antikörper generiert werden, die wiederum gegen das C-Fragment gerichtet sind. Mit Hilfe dieser Technik könnte so z.B. die Rolle der IgG-Subklassen bei der Entstehung und dem Verlauf der Krankheit weiter untersucht werden. Für die zukünftige Immunisierung von Mäusen oder Kaninchen im Rahmen des aktiven oder passiven Tiermodells bietet das hergestellte Protein den Vorteil, dass auf die Immunisierung von weiteren Tieren mit GST als Kontrolle verzichtet werden kann. Außerdem kann das C-Fragment im Rahmen der aktiven Immunisierung von Mäusen dazu verwendet werden, um die Funktion von gekoppelten Antigenen bei der Induktion einer Immunantwort zu untersuchen. Es ist bekannt, dass an GST gekoppelte Proteine nach Injektion eine stärkere Immunantwort in Tieren hervorrufen als ungekoppelte Proteine. Die immunmodulierende Wirkung des GST sowie die molekularen Mechanismen bei der Entstehung einer Autoimmunerkrankung im Tiermodell könnten mit Hilfe des nicht modifizierten Antigens genauer erforscht werden.

## Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Fragment der NC1-Domäne des murinen Kollagen Typ VII in Bakterien exprimiert und aufgereinigt werden. Mit Hilfe dieses 210 Aminosäuren großen Proteins konnte ein ELISA entwickelt werden, mit dem im Mausmodell der EBA Antikörper aus den Seren erkrankter Tiere detektiert werden können. Die Verwendung eines nicht-modifizierten Antigens in dem neuen ELISA zeigte hinsichtlich der Aussagekraft keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu einem bereits etablierten ELISA-Verfahren. Die Vorteile dieser neuen Methode bestehen jedoch in der Praktikabilität, der Vereinfachung der Auswertung und in der Halbierung der eingesetzten Serummengen und Verbrauchsmaterialien.

Diese Methode soll dazu beitragen, dass im aktiven Mausmodell der EBA neue Erkenntnisse über die zellulären und molekularen Mechanismen der Erkrankung gewonnen werden und somit Fortschritte für die Entwicklung neuer Therapieansätze gemacht werden können. Für den Einsatz des hergestellten Proteins bieten sich neben der Verwendung als Antigen im ELISA weitere Möglichkeiten: Das Fragment der NC1-Domäne kann z.B. bei der Affinitätsaufreinigung von Autoantikörpern eingesetzt oder für die Immunisierung von Mäusen verwendet werden.

## Zusammenfassung

Die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) ist eine chronische, Blasen bildende Autoimmunerkrankung, die durch die Entstehung von subepidermalen Blasen, sowie zirkulierenden und gewebegebundenen Antikörpern gegen Kollagen Typ VII gekennzeichnet ist. Die Autoantikörper richten sich gegen Epitope, die auf der nicht-kollagenen (NC) Domäne 1 des Kollagen Typ VII, einem wichtigen Strukturprotein der dermo-epidermalen Junktionszone, gelegen sind. Durch die Immunisierung von Mäusen mit einem rekombinanten Fragment der NC1-Domäne war bereits ein aktives Tiermodell der EBA etabliert worden. Für die Detektierung von Antikörpern stand ein ELISA zur Verfügung, bei dem ein Antigen verwendet wird, das an eine Gluthathion S-Transferase (GST) gekoppelt vorliegt. Diese Koppelung verursacht zeitaufwendige und fehleranfällige Messungen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine ELISA-Methode zu entwickeln, bei der das verwendete Antigen in nicht-modifizierter Form vorliegt. Diese Methode wurde hinsichtlich ihrer Durchführbarkeit und ihrer Aussagekraft im Vergleich mit dem etablierten Verfahren überprüft. Zu diesem Zweck wurde ein Fragment der NC1-Domäne in Bakterien exprimiert und mit Hilfe eines sich selbst-bspaltenden Inteins in reiner Form aufgereinigt. Die Fähigkeit dieses Proteins, Antikörper aus den Seren von an EBA erkrankten Mäusen zu detektieren, wurde im Immunoblot und in dem neu entwickelten ELISA demonstriert. Im Vergleich der Aussagekraft zeigen beide Verfahren eine ähnliche Korrelation zwischen der Krankheitsausprägung der immunisierten Mäuse und den Antikörperspiegeln im Serum der erkrankten Tiere.

Mit dem hergestellten Fragment der NC1-Domäne konnte eine ELISA entwickelt werden, mit der Antikörper detektiert werden können und die im Vergleich mit einem etablierten Verfahren Vorteile bezüglich der Durchführbarkeit und der Effizienz bietet. Neben dem ELISA kann dieses Protein in Zukunft auch für die Aufreinigung und Herstellung von rekombinanten Antikörpern sowie für die Immunisierung von Tieren verwendet werden.

## Literaturverzeichnis

1. Allbritton JI, Nousari HC, Anhalt GJ. Anti-epiligrin (laminin 5) cicatricial pemphigoid. *The British journal of dermatology*. 1997;137:992-996.
2. Barber HW. Epidermolysis bullosa acquisita. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 1948;41:105.
3. Bentz H, Morris NP, Murray LW, et al. Isolation and partial characterization of a new human collagen with an extended triple-helical structural domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983;80:3168-3172.
4. Bernard P, Vaillant L, Labeille B, et al. Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group. *Archives of dermatology*. 1995;131:48-52.
5. Bertram F, Brocker EB, Zillikens D, et al. Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2009;7:434-440.
6. Bhol KC, Goss L, Kumari S, et al. Autoantibodies to human alpha6 integrin in patients with oral pemphigoid. *Journal of dental research*. 2001;80:1711-1715.
7. Bieber K, Sun S, Ishii N, et al. Animal models for autoimmune bullous dermatoses. *Experimental dermatology*. 19:2-11.
8. Borradori L, Caldwell JB, Briggaman RA, et al. Passive transfer of autoantibodies from a patient with mutilating epidermolysis bullosa acquisita induces specific alterations in the skin of neonatal mice. *Archives of dermatology*. 1995;131:590-595.
9. Briggaman RA, Wheeler CE, Jr. The epidermal-dermal junction. *The Journal of investigative dermatology*. 1975;65:71-84.
10. Bruckner-Tuderman L, Rantala I, Reunala T. Evidence for a structural abnormality of collagen VII in a patient with dystrophic epidermolysis bullosa inversa. *The Journal of investigative dermatology*. 1992;98:141-146.
11. Bruckner-Tuderman L, Ruegger S, Odermatt B, et al. Lack of type VII collagen in unaffected skin of patients with severe recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Dermatologica*. 1988;176:57-64.
12. Burgeson RE. Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology*. 1993;101:252-255.
13. Callot-Mellot C, Bodemer C, Caux F, et al. Epidermolysis bullosa acquisita in childhood. *Archives of dermatology*. 1997;133:1122-1126.
14. Chen M, Chan LS, Cai X, et al. Development of an ELISA for rapid detection of anti-type VII collagen autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita. *The Journal of investigative dermatology*. 1997;108:68-72.

15. Chen M, Keene DR, Costa FK, et al. The carboxyl terminus of type VII collagen mediates antiparallel dimer formation and constitutes a new antigenic epitope for epidermolysis bullosa acquisita autoantibodies. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:21649-21655.
16. Chen M, Marinkovich MP, Jones JC, et al. NC1 domain of type VII collagen binds to the beta3 chain of laminin 5 via a unique subdomain within the fibronectin-like repeats. *The Journal of investigative dermatology*. 1999;112:177-183.
17. Chen M, O'Toole EA, Sanghavi J, et al. The epidermolysis bullosa acquisita antigen (type VII collagen) is present in human colon and patients with crohn's disease have autoantibodies to type VII collagen. *The Journal of investigative dermatology*. 2002;118:1059-1064.
18. Chiriac MT, Roesler J, Sindrilaru A, et al. NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *The Journal of pathology*. 2007;212:56-65.
19. Cho JW, Nakano H, Lee KS. Type VII collagen gene mutations (c.8569G>T and c.4879G>A) result in the moderately severe phenotype of recessive dystrophic epidermolysis bullosa in a Korean patient. *Journal of Korean medical science*. 2009;24:256-261.
20. Chorzelski T, Karczewska K, Dyduch A, et al. Epidermolysis bullosa acquisita in a 4-year-old boy. *Pediatric dermatology*. 2000;17:157-158.
21. Collins ED, Espinoza A, Le LT, et al. Cloning the human vitamin D receptor into the pTwin-1 expression vector. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*.
22. Crowther JR. *The ELISA Guidebook*. Humana Press Inc.; 2000.
23. Dahl MG. Epidermolysis bullosa acquisita--a sign of cicatricial pemphigoid? *The British journal of dermatology*. 1979;101:475-484.
24. Delbaldo C, Chen M, Friedli A, et al. Drug-induced epidermolysis bullosa acquisita with antibodies to type VII collagen. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2002;46:S161-164.
25. Diaz LA, Ratrie H, 3rd, Saunders WS, et al. Isolation of a human epidermal cDNA corresponding to the 180-kD autoantigen recognized by bullous pemphigoid and herpes gestationis sera. Immunolocalization of this protein to the hemidesmosome. *The Journal of clinical investigation*. 1990;86:1088-1094.
26. Domloge-Hultsch N, Anhalt GJ, Gammon WR, et al. Antiepiligrin cicatricial pemphigoid. A subepithelial bullous disorder. *Archives of dermatology*. 1994;130:1521-1529.

27. Ee HL, Liu L, Goh CL, et al. Clinical and molecular dilemmas in the diagnosis of familial epidermolysis bullosa pruriginosa. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2007;56:S77-81.
28. Gammon WR, Briggaman RA. Epidermolysis bullosa acquisita and bullous systemic lupus erythematosus. Diseases of autoimmunity to type VII collagen. *Dermatologic clinics*. 1993;11:535-547.
29. Gammon WR, Briggaman RA, Inman AO, 3rd, et al. Differentiating anti-lamina lucida and anti-sublamina densa anti-BMZ antibodies by indirect immunofluorescence on 1.0 M sodium chloride-separated skin. *The Journal of investigative dermatology*. 1984;82:139-144.
30. Gammon WR, Briggaman RA, Woodley DT, et al. Epidermolysis bullosa acquisita--a pemphigoid-like disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1984;11:820-832.
31. Gammon WR, Heise ER, Burke WA, et al. Increased frequency of HLA-DR2 in patients with autoantibodies to epidermolysis bullosa acquisita antigen: evidence that the expression of autoimmunity to type VII collagen is HLA class II allele associated. *The Journal of investigative dermatology*. 1988;91:228-232.
32. Gammon WR, Murrell DF, Jenison MW, et al. Autoantibodies to type VII collagen recognize epitopes in a fibronectin-like region of the noncollagenous (NC1) domain. *The Journal of investigative dermatology*. 1993;100:618-622.
33. Gandhi K, Chen M, Aasi S, et al. Autoantibodies to type VII collagen have heterogeneous subclass and light chain compositions and their complement-activating capacities do not correlate with the inflammatory clinical phenotype. *Journal of clinical immunology*. 2000;20:416-423.
34. Ghohestani RF, Hudson BG, Claudy A, et al. The alpha 5 chain of type IV collagen is the target of IgG autoantibodies in a novel autoimmune disease with subepidermal blisters and renal insufficiency. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275:16002-16006.
35. Ghohestani RF, Rotunda SL, Hudson B, et al. Crescentic glomerulonephritis and subepidermal blisters with autoantibodies to alpha5 and alpha6 chains of type IV collagen. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2003;83:605-611.
36. Giudice GJ, Liu Z, Diaz LA. An animal model of bullous pemphigoid: what can it teach us? *Proceedings of the Association of American Physicians*. 1995;107:237-241.
37. Giudice GJ, Squiquera HL, Elias PM, et al. Identification of two collagen domains within the bullous pemphigoid autoantigen, BP180. *The Journal of clinical investigation*. 1991;87:734-738.

38. Hakki SS, Celenligil-Nazliel H, Karaduman A, et al. Epidermolysis bullosa acquisita: clinical manifestations, microscopic findings, and surgical periodontal therapy. A case report. *Journal of periodontology*. 2001;72:550-558.
39. Hallel-Halevy D, Nadelman C, Chen M, et al. Epidermolysis bullosa acquisita: update and review. *Clinics in dermatology*. 2001;19:712-718.
40. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*. 1983;166:557-580.
41. Harman KE, Whittam LR, Wakelin SH, et al. Severe, refractory epidermolysis bullosa acquisita complicated by an oesophageal stricture responding to intravenous immune globulin. *The British journal of dermatology*. 1998;139:1126-1127.
42. Herrero-Gonzalez JE, Mascaro JM, Jr., Herrero C, et al. Autoantibodies from patients with BSLE inducing recruitment of leukocytes to the dermoepidermal junction and subepidermal splits in cryosections of human skin. *Archives of dermatology*. 2006;142:1513-1516.
43. Hughes BR, Horne J. Epidermolysis bullosa acquisita and total ulcerative colitis. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 1988;81:473-475.
44. Humphries HE, Williams JN, Christodoulides M, et al. Recombinant meningococcal PorA protein, expressed using a vector system with potential for human vaccination, induces a bactericidal immune response. *Vaccine*. 2004;22:1564-1569.
45. Ishii N, Hamada T, Dainichi T, et al. Epidermolysis bullosa acquisita: what's new? *The Journal of dermatology*. 37:220-230.
46. Ishii N, Yoshida M, Hisamatsu Y, et al. Epidermolysis bullosa acquisita sera react with distinct epitopes on the NC1 and NC2 domains of type VII collagen: study using immunoblotting of domain-specific recombinant proteins and postembedding immunoelectron microscopy. *The British journal of dermatology*. 2004;150:843-851.
47. Ishii N, Yoshida M, Ishida-Yamamoto A, et al. Some epidermolysis bullosa acquisita sera react with epitopes within the triple-helical collagenous domain as indicated by immunoelectron microscopy. *The British journal of dermatology*. 2009;160:1090-1093.
48. Kalluri R, Danoff TM, Okada H, et al. Susceptibility to anti-glomerular basement membrane disease and Goodpasture syndrome is linked to MHC class II genes and the emergence of T cell-mediated immunity in mice. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100:2263-2275.
49. Karachunski PI, Ostlie NS, Monfardini C, et al. Absence of IFN-gamma or IL-12 has different effects on experimental myasthenia gravis in C57BL/6 mice. *J Immunol*. 2000;164:5236-5244.
50. Keene DR, Sakai LY, Lunstrum GP, et al. Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *The Journal of cell biology*. 1987;104:611-621.

51. Kemeny DM. *A Practical Guide to ELISA*. Pergamon; 1991.
52. Kirtschig G, Marinkovich MP, Burgeson RE, et al. Anti-basement membrane autoantibodies in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid bind the alpha subunit of laminin 5. *The Journal of investigative dermatology*. 1995;105:543-548.
53. Kumari S, Bhol KC, Simmons RK, et al. Identification of ocular cicatricial pemphigoid antibody binding site(s) in human beta4 integrin. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2001;42:379-385.
54. Kurzhals G, Stolz W, Meurer M, et al. Acquired epidermolysis bullosa with the clinical feature of Brunsting-Perry cicatricial bullous pemphigoid. *Archives of dermatology*. 1991;127:391-395.
55. Labeille B, Gineston JL, Denoeux JP, et al. Epidermolysis bullosa acquisita and Crohn's disease. A case report with immunological and electron microscopic studies. *Archives of internal medicine*. 1988;148:1457-1459.
56. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.
57. Lapiere JC, Woodley DT, Parente MG, et al. Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. *The Journal of clinical investigation*. 1993;92:1831-1839.
58. Lazarova Z, Yee C, Darling T, et al. Passive transfer of anti-laminin 5 antibodies induces subepidermal blisters in neonatal mice. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98:1509-1518.
59. Lehman JS, Camilleri MJ, Gibson LE. Epidermolysis bullosa acquisita: concise review and practical considerations. *International journal of dermatology*. 2009;48:227-235; quiz 235-226.
60. Leigh IM, Eady RA, Heagerty AH, et al. Type VII collagen is a normal component of epidermal basement membrane, which shows altered expression in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology*. 1988;90:639-642.
61. Leighty L, Li N, Diaz LA, et al. Experimental models for the autoimmune and inflammatory blistering disease, Bullous pemphigoid. *Archives of dermatological research*. 2007;299:417-422.
62. Leverkus M, Bhol K, Hirako Y, et al. Cicatricial pemphigoid with circulating autoantibodies to beta4 integrin, bullous pemphigoid 180 and bullous pemphigoid 230. *The British journal of dermatology*. 2001;145:998-1004.
63. Leverkus M, Georgi M, Nie Z, et al. Cicatricial pemphigoid with circulating IgA and IgG autoantibodies to the central portion of the BP180 ectodomain: beneficial effect of ad-

- juvant therapy with high-dose intravenous immunoglobulin. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2002;46:116-122.
64. Liu Z, Diaz LA, Troy JL, et al. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *The Journal of clinical investigation*. 1993;92:2480-2488.
  65. Liu Z, Giudice GJ, Swartz SJ, et al. The role of complement in experimental bullous pemphigoid. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95:1539-1544.
  66. Louloudiadis AK, Louloudiadis KA. Case report: Dystrophic Epidermolysis Bullosa: dental management and oral health promotion. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2009;10:42-45.
  67. Lunstrum GP, Sakai LY, Keene DR, et al. Large complex globular domains of type VII procollagen contribute to the structure of anchoring fibrils. *The Journal of biological chemistry*. 1986;261:9042-9048.
  68. Memar OM, Rajaraman S, Thotakura R, et al. Recombinant desmoglein 3 has the necessary epitopes to adsorb and induce blister-causing antibodies. *The Journal of investigative dermatology*. 1996;106:261-268.
  69. Mihai S, Chiriac MT, Takahashi K, et al. The alternative pathway of complement activation is critical for blister induction in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Immunol*. 2007;178:6514-6521.
  70. Mihai S, Sitaru C. Immunopathology and molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2007;11:462-481.
  71. Morris NP, Keene DR, Glanville RW, et al. The tissue form of type VII collagen is an antiparallel dimer. *The Journal of biological chemistry*. 1986;261:5638-5644.
  72. Muller M, Viscidi RP, Sun Y, et al. Antibodies to HPV-16 E6 and E7 proteins as markers for HPV-16-associated invasive cervical cancer. *Virology*. 1992;187:508-514.
  73. Nanda A, Dvorak R, Al-Saeed K, et al. Spectrum of autoimmune bullous diseases in Kuwait. *International journal of dermatology*. 2004;43:876-881.
  74. Nousari HC, Rencic A, Hsu R, et al. Anti-epiligrin cicatricial pemphigoid with antibodies against the gamma2 subunit of laminin 5. *Archives of dermatology*. 1999;135:173-176.
  75. Olivry T, Dunston SM, Zhang G, et al. Laminin-5 is targeted by autoantibodies in feline mucous membrane (cicatricial) pemphigoid. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2002;88:123-129.
  76. Orfuss AJ. Epidermolysis bullosa acquisita. *A M A*. 1951;64:794.
  77. Parente MG, Chung LC, Ryyanen J, et al. Human type VII collagen: cDNA cloning and chromosomal mapping of the gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88:6931-6935.

78. Pass F, Dobson RL. Epidermolysis Bullosa Acquisita: a Disease of Dermal Connective Tissue. *Archives of dermatology*. 1965;91:219-223.
79. Ralf J. Ludwig, Andreas Recke, Katja Bieber, et al. Generation of antibodies of distinct subclasses and specificity is linked to H2s in an active mouse model of epidermolysis bullosa acquisita  
*Journal of Investigative Dermatology*. 2010;Artikel im Druck.
80. Ray TL, Levine JB, Weiss W, et al. Epidermolysis bullosa acquisita and inflammatory bowel disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1982;6:242-252.
81. Roenigk HH, Jr., Ryan JG, Bergfeld WF. Epidermolysis bullosa acquisita. Report of three cases and review of all published cases. *Archives of dermatology*. 1971;103:1-10.
82. Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunology today*. 1993;14:426-430.
83. Sakai LY, Keene DR, Morris NP, et al. Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *The Journal of cell biology*. 1986;103:1577-1586.
84. Schmidt E, Hopfner B, Chen M, et al. Childhood epidermolysis bullosa acquisita: a novel variant with reactivity to all three structural domains of type VII collagen. *The British journal of dermatology*. 2002;147:592-597.
85. Schmidt E, Obe K, Brocker EB, et al. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Archives of dermatology*. 2000;136:174-178.
86. Schmidt E, Zillikens D. Research in practice: diagnosis of subepidermal autoimmune bullous disorders. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2009;7:296-300.
87. Shigemoto T, Nashiro K, Tsuchida T, et al. Administration of IgG fraction of epidermolysis bullosa acquisita (EBA) serum into mice. *The Journal of dermatology*. 1988;15:123-127.
88. Shimanovich I, Mihai S, Oostingh GJ, et al. Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *The Journal of pathology*. 2004;204:519-527.
89. Sitaru C. Experimental models of epidermolysis bullosa acquisita. *Experimental dermatology*. 2007;16:520-531.
90. Sitaru C, Chiriac MT, Mihai S, et al. Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice. *J Immunol*. 2006;177:3461-3468.
91. Sitaru C, Goebeler M, Zillikens D. [Bullous autoimmune dermatoses (I): Pathogenesis and diagnosis]. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2004;2:123-128; quiz 139-140.

92. Sitaru C, Kromminga A, Hashimoto T, et al. Autoantibodies to type VII collagen mediate Fcγ-dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *The American journal of pathology*. 2002;161:301-311.
93. Sitaru C, Mihai S, Otto C, et al. Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115:870-878.
94. Sitaru C, Mihai S, Zillikens D. The relevance of the IgG subclass of autoantibodies for blister induction in autoimmune bullous skin diseases. *Archives of dermatological research*. 2007;299:1-8.
95. Sitaru C, Zillikens D. Mechanisms of blister induction by autoantibodies. *Experimental dermatology*. 2005;14:861-875.
96. Stanley JR, Hawley-Nelson P, Yaar M, et al. Laminin and bullous pemphigoid antigen are distinct basement membrane proteins synthesized by epidermal cells. *The Journal of investigative dermatology*. 1982;78:456-459.
97. Stanley JR, Hawley-Nelson P, Yuspa SH, et al. Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell*. 1981;24:897-903.
98. Stanley JR, Rubinstein N, Klaus-Kovtun V. Epidermolysis bullosa acquisita antigen is synthesized by both human keratinocytes and human dermal fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology*. 1985;85:542-545.
99. Stewart MI, Woodley DT, Briggaman RA. Epidermolysis bullosa acquisita and associated symptomatic esophageal webs. *Archives of dermatology*. 1991;127:373-377.
100. Tanaka T, Matsuyoshi N, Furukawa F, et al. Production of monoclonal antibodies against the N-terminal noncollagenous domain of type VII collagen encoded by epidermolysis bullosa acquisita antigen cDNA. *Dermatology (Basel, Switzerland)*. 1994;189 Suppl 1:42-45.
101. Trigo-Guzman FX, Conti A, Aoki V, et al. Epidermolysis bullosa acquisita in childhood. *The Journal of dermatology*. 2003;30:226-229.
102. Tsuji-Abe Y, Akiyama M, Yamanaka Y, et al. Correlation of clinical severity and ELISA indices for the NC16A domain of BP180 measured using BP180 ELISA kit in bullous pemphigoid. *Journal of dermatological science*. 2005;37:145-149.
103. Tsunoda K, Ota T, Aoki M, et al. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J Immunol*. 2003;170:2170-2178.
104. Witebsky E, Rose NR, Paine JR, et al. Thyroid-specific autoantibodies. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1957;69:669-677.

105. Wong SN, Chua SH. Spectrum of subepidermal immunobullous disorders seen at the National Skin Centre, Singapore: a 2-year review. *The British journal of dermatology*. 2002;147:476-480.
106. Woodley DT, Briggaman RA, O'Keefe EJ, et al. Identification of the skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. *The New England journal of medicine*. 1984;310:1007-1013.
107. Woodley DT, Burgeson RE, Lunstrum G, et al. Epidermolysis bullosa acquisita antigen is the globular carboxyl terminus of type VII procollagen. *The Journal of clinical investigation*. 1988;81:683-687.
108. Woodley DT, Chang C, Saadat P, et al. Evidence that anti-type VII collagen antibodies are pathogenic and responsible for the clinical, histological, and immunological features of epidermolysis bullosa acquisita. *The Journal of investigative dermatology*. 2005;124:958-964.
109. Woodley DT, Ram R, Doostan A, et al. Induction of epidermolysis bullosa acquisita in mice by passive transfer of autoantibodies from patients. *The Journal of investigative dermatology*. 2006;126:1323-1330.
110. Yamamoto T, Kihara I, Morita T, et al. Attachment of polymorphonuclear leukocytes to glomeruli with immune deposits. *Journal of immunological methods*. 1979;26:315-323.
111. Yaoita H, Briggaman RA, Lawley TJ, et al. Epidermolysis bullosa acquisita: ultrastructural and immunological studies. *The Journal of investigative dermatology*. 1981;76:288-292.
112. Zhu XJ, Niimi Y, Bystryn JC. Epidermolysis bullosa acquisita. Incidence in patients with basement membrane zone antibodies. *Archives of dermatology*. 1990;126:171-174.
113. Zillikens D, Kawahara Y, Ishiko A, et al. A novel subepidermal blistering disease with autoantibodies to a 200-kDa antigen of the basement membrane zone. *The Journal of investigative dermatology*. 1996;106:1333-1338.
114. Zillikens D, Mascaro JM, Rose PA, et al. A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *The Journal of investigative dermatology*. 1997;109:679-683.

**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung</b>	<b>Seite</b>
1. Entzündliche Variante der Epidermolysis bullosa acquisita.	2
2. Schematische Darstellung der dermo-epidermalen Junktionszone mit wichtigen Zielantigene bullöser Autoimmundermatosen.	4
3. Nachweis von IgG- und Komplementablagerungen entlang der Dermo-epidermalen Junktionszone.	5
4. Schematische Darstellung des pTwin1- Vektors.	13
5. Schematische Darstellung der Expression von Fusionsproteinen.	14
6. Schematische Darstellung der Ligation.	16
7. Amplifizierung des mCol VIIc DNA-Fragments.	29
8. Analyse von verschiedenen Bakterienkolonien nach der Transformation durch Kolonie-PCR	30
9. Restriktionsverdau des pTwin1-mCol VIIc-Vektors	31
10. Expression und Immundetektierung von Fusionsproteinen	32
11. Abgleich der Sequenzierungsdaten	33
12. Analyse der Proteinexpression und der Affinitätsaufreinigung	34
13. SDS-Gelelektrophorese	35
14. Immunoblot nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran	36
15. Analyse der Fraktionen nach Ionenaustauschchromatographie (IAChr)	37
16. Analyse der Fraktionen nach Ionenaustauschchromatographie durch SDS- PAGE	37
17. Titration mit Verdünnungsreihe des mCol VIIc-Proteins und eines Mäuseserums	38
18. Ermittlung des Schwellenwertes als Einschlusskriterium für die Bestimmung von Antikörpern mittels GST-mColVIIc- und mCol VIIc-ELISA	40
19. Darstellung der Extinktionswerte, die mit reinem mCol VIIC und mit GST-mCol VIIC als Antigen im ELISA gemessen wurden	41
20. Klinischer Score der immunisierten Mäuse und mittels mCol VIIC-ELISA gemessene Extinktionswerte	42

21. Klinischer Score der immunisierten Mäuse und mittels GST-mCol VIIC-ELISA gemessene Extinktionswerte	42
22. Korrelation zwischen klinischem Score und Extinktionswerten in verschiedenen Mausstämmen	44

### **Tabellenverzeichnis**

	<b>Seite</b>
1. Nukleotidsequenz des Vorwärtsprimer ( FP ) und des Rückwärtsprimer ( RP)	11
2. Nukleotidsequenzen der verwendeten Sequenzierungsprimer	19
3. Übersicht Mausdaten	43

## **Publikation**

Shi-jie Sun, Andreas Recke, Thorben Fründt, Detlef Zillikens, Ralf J Ludwig:  
*OX40/OX40 ligand interaction enhances the development of autoantibody mediated epidermolysis bullosa acquisita*, in Vorbereitung.

## Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. Dr. rer. nat. E. Schmidt für die Überlassung des Themas, für die Ratschläge und seine Unterstützung sowie Herrn Prof. Dr. med. D. Zillikens, Direktor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck, für die Bereitstellung der Laboratorien und Materialien für die Durchführung der Experimente.

Mein besonderer Dank gilt dem Betreuer dieser Arbeit, Dr. med. A. Recke, für die vielen Hilfestellungen bei allen auftauchenden Problemen, seine große Geduld und seine stets motivierenden und aufmunternden Worte. Herrn Prof. Dr. med. R. Ludwig danke ich besonders für die vielen Anregungen und richtungweisenden Beratung. PD Dr. med. C. Sitaru danke ich für die Hilfe bei der Primerauswahl. Frau Dipl. Biol. Susen Müller möchte ich besonders für das Überlassen der Mäuseseren danken. Weiterhin gilt mein Dank Shi-ji Sun für seine kritische Begutachtung und seine beratende Unterstützung bei der Etablierung des ELISAs.

Mein besonderer Dank gilt Miriam Freitag und Alina Graef für die Unterstützung bei den Tätigkeiten im Labor und die tolle Arbeitsatmosphäre. Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe „Bullöse Dermatosen“ der Klinik für Dermatologie der Universität Lübeck für die sehr gute Zusammenarbeit und die nette Gemeinschaft im Labor danken.

Mein großer persönlicher Dank gilt Sarah-Louise Nause für ihr Verständnis, ihre großartige Unterstützung und für das Erdulden eines Doktoranden beim Durchführen seiner Doktorarbeit. Meinen Eltern danke ich ganz besonders für den Rückhalt in all den Jahren, dass sie mich immer begleitet und beraten haben und dass sie mir es durch die Unterstützung meines Studiums überhaupt ermöglicht haben, Arzt zu werden. Ohne ihre Hilfe hätte ich diese Arbeit niemals schreiben können. Wiebke Fründt danke ich vor allem für aufmunternde Worte, verständnisvolles Zuhören und ihre unzähligen Hilfen von meinen ersten Schritten an. Irene Fründt und Christa Schrader danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz, ihre Ratschläge, Worte und Weisheiten und ihre fortwährende Hilfe.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Fründt  
Vorname: Thorben Wilhelm  
Geburtsdatum: 16. 09. 1982  
Geburtsort: Hildesheim  
Eltern: Holger Fründt,  
Eva-Maria Fründt, geb. Schrader  
Geschwister: Wiebke Fründt  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1989 – 1993 Grundschule Himmelsthür  
1993 – 1995 Orientierungsstufe Himmesthür  
1995 – 2002 Gymnasium Himmelsthür, Kreisgymnasium des Landkreis Hildesheim

### Zivildienst:

2002 – 2003 Niedersächsisches Landesamt für Ökologie, Hildesheim

### Studium:

Seit WS 2003/04: Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck.  
Frühjahr 2005: 1. Staatsexamen  
2008 – 2009: Student im praktischen Jahr  
Frühjahr 2010: 2. Staatsexamen  
Juni 2010: Approbation als Arzt