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

Untersuchung zu Autoantikörpern gegen Strukturproteine der dermo-epidermalen Junktionszone bei Patienten mit chronischen juckenden Dermatosen

INAUGURALDISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Frauke Riechert
aus Münster
(Westfalen)

Lübeck 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Enno Schmidt

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Michael Müller-Steinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2014

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 06.06.2014

Promotionskommission der Sektion Medizin.

Meinen Eltern
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis IV

1 Einleitung 1
- 1.1 Blasen bildende Autoimmundermatosen 1
- 1.2 Pemphigoid-Erkrankungen 3
- 1.3 Bullöses Pemphigoid 3

2 Fragestellung 9

3 Material und Methoden 10
- 3.1 Patienten 10
- 3.2 Negative Kontrollseren 13
- 3.3 Antikörper 14
- 3.4 Indirekte Immunfluoreszenz 16
- 3.5 Enzymed-linked immuno sorbent-assay (ELISA) 16
- 3.6 Kultur von HaCaT-Keratinozyten 16
- 3.7 Gewinnung von Zellkulturüberstand konditionierter kultivierter HaCaT-Keratinozyten zur Herstellung der löslichen extrazellulären Domäne von BP180 (LAD-1) 17
- 3.8 Expression von GST-BP180-NC16A und GST 18
- 3.9 Herstellung von Keratinozytenextrakt (KCE) 19
- 3.10 Herstellung von Extrakt aus humaner Dermis (DE) 19
- 3.11 Herstellung eines Extraktes der extrazellulären Matrix kultivierter HaCaT-Keratinozyten zum Nachweis von Anti-Laminin 332 Reaktivität (ECM) 20
- 3.12 Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese 20
- 3.13 Proteintransfer 21
- 3.14 Immunoblot 22
- 3.15 Detektion 22
- 3.16 Statistik 23

4 Ergebnisse 25
- 4.1 Indirekte Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut 26
- 4.2 BP180- NC16A und BP230 ELISA 27
- 4.3 Immunoblot mit Überstand kultivierter humaner Keratinozyten (LAD-1) 29
- 4.4 Immunoblot mit rekombinantem BP180 NC16A (NC16A) 30
- 4.5 Immunoblot mit Extrakt kultivierter humaner Keratinozyten (KCE) 30

4.6 Dermales Extrakt (DE) 31
4.7 Immunoblot mit extrazellulärer Matrix (ECM) kultivierter humanisierter Keratinozyten 32
4.8 Deskriptive Statistik 33
4.9 Analysen 35

5 Diskussion 36

Ausblick 52

6 Zusammenfassung 53

7 Literaturverzeichnis 55

8 Anhang 74
8.1 Abkürzungsverzeichnis 74
8.2 Material 76
8.3 Tabelle mit allen Ergebnissen 82
8.5 Publikation 85
8.6 Danksagung 86

Lebenslauf 87

Eidesstattliche Erklärung 88

1 Einleitung

1.1 Blasen bildende Autoimmundermatosen

Blasen bildende Autoimmundermatosen stellen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen dar, die durch das Auftreten von Autoantikörpern gegen Strukturproteine der Haut gekennzeichnet sind (Tab. 1.1). Diese Proteine sind für den Zell-Zell-Kontakt der Keratinozyten oder für die Adhäsion der Epidermis auf der Dermis essentiell [Schmidt & Zillikens, 2011]. (Abb.1.1)

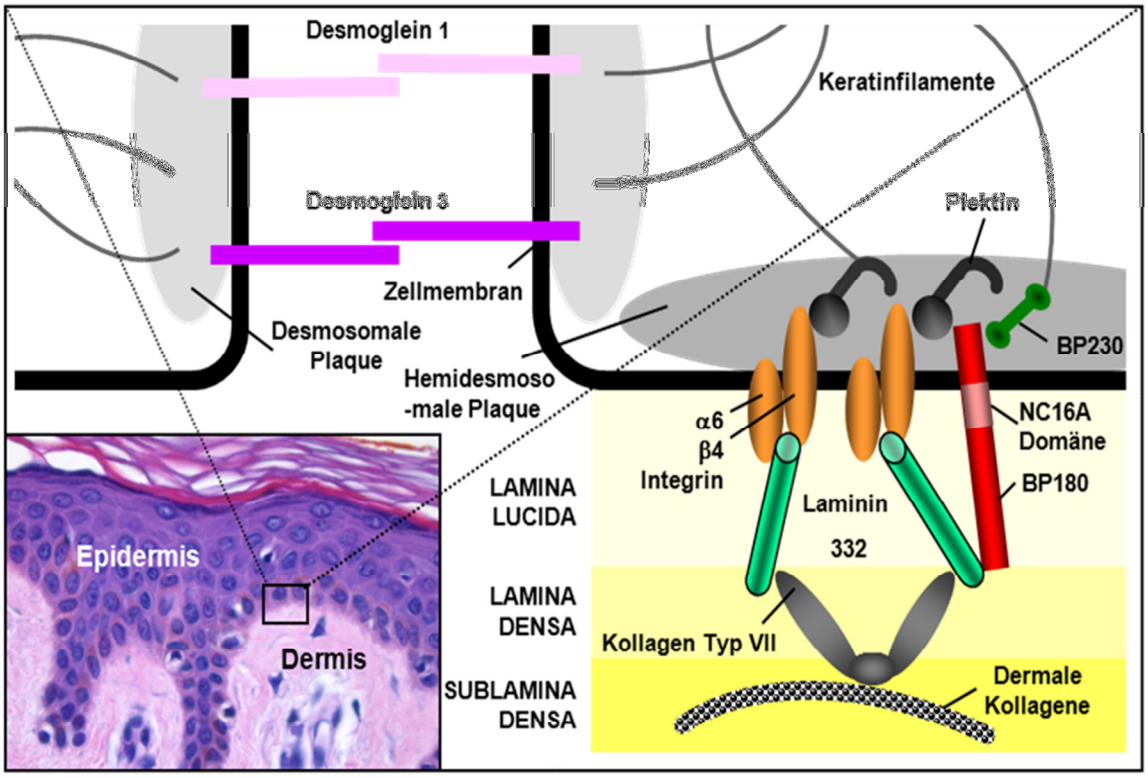

Abb. 1.1 Darstellung der Strukturproteine der Haut, die Zielantigene bullöser Autoimmundermatosen darstellen [aus: Schmidt & Zillikens, 2011]
Desmosomen sind aus zwei Anteilen aufgebaut: den intrazellulär gelegenen Proteinen der desmosomalen Plaque und den transmembranösen Cadherinen (z.B. Desmogleinen), die mittels calciumabhängiger Interaktionen die Verbindung benachbarter Keratinozyten vermitteln. Die zentrale Struktur der dermo-epidermalen Junktionszone bildet die hemidesmosomale Plaque, deren Proteine eine Verbindung der Zytokinfilamente mit den transmembranösen Ankerfilamenten (BP180, $\alpha_6\beta_4$-Integrin) herstellt. Die extrazellulären Anteile von BP180, $\alpha_6\beta_4$-Integrin finden über Laminin 332 Kontakt zu Verankerungsfibrillen (Kollagen Typ VII).

Hinsichtlich der Zielstrukturen werden vier Hauptgruppen unterschieden:

- Pemphiguserkrankungen
- Pemphigoiderkrankungen
- Epidermolysis bullosa acquisita
- Dermatitis herpetiformis Duhring [Rose et al. 2007]

Bei den Pemphiguserkrankungen liegt die Blasenbildung intra-, bei den übrigen bullösen Autoimmundermatosen subepidermal.

Tabelle 1.1 Zielantigene bullöser Autoimmundermatosen

[Schmidt & Zillikens, 2011]

Strukturprotein	Blasen bildende Autoimmundermatose
Desmoglein 1	Pemphigus foliaceus,
	Pemphigus vulgaris, paraneoplastischer Pemphigus
Desmoglein 3	Pemphigus vulgaris, paraneoplastischer Pemphigus
BP180	bullöses Pemphigoid,
	Pemphigoid gestationis, Lichen planus pemphigoides,
	lineare IgA-Dermatose, Schleimhautpemphigoid
BP230	bullöses Pemphigoid, Pemphigoid gestationis,
	Schleimhautpemphigoid, lineare IgA-Dermatose
α6β4-Integrin	Schleimhautpemphigoid
Laminin 332	Schleimhautpemphigoid
Kollagen Typ VII	Epidermolysis bullosa acquisita, bullöser SLE
SLE: systemischer Lupus erythematodes	

Die Ätiologie der Autoantikörperbildung bei den Blasen bildendenden Autoimmundermatosen ist unklar [Yancey, 2005; Kasperkiewicz et al. 2012].

Für die histopathologische Untersuchung ist bei allen bullösen Autoimmundermatosen die Biopsie eines möglichst frischen Bläschens zu empfehlen [Rose et al. 2007]. Eine zwingende Voraussetzung für die Diagnose stellt der Nachweis der Autoantikörper in der Haut (durch eine direkte Immunfluoreszenz) und/ oder im Serum der Patienten dar [Mutasim et al. 2005; Schmidt & Zillikens, 2010]. Die zirkulierenden Autoantikörper können durch die indirekte Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten menschlicher Haut nachgewiesen und ihre Spezifität durch Immunoblot oder ELISA unter Verwendung zellulärer oder rekombinanter Formen der Zielantigene bestimmt werden. Häufig ist die Diagnose daher bereits durch eine serologische Untersuchung möglich [Schmidt & Zillikens, 2010].

1.2 Pemphigoid-Erkrankungen

Pemphigoiderkrankungen sind durch subepidermale Blasen und Autoantikörper gegen hemidesmosomale Strukturproteine gekennzeichnet [Schmidt & Zillikens, 2013] (Tab. 1.1.). Hemidesmosomen verankern die basalen Keratinozyten in der Basalmembranzone und dem Hautbindegewebe [Kowalczyk et al. 1999; Zillikens & Guidice, 1999]. Klinisch, histologisch, immunpathologisch und molekularbiologisch lassen sich verschiedene Pemphigoiderkrankungen unterscheiden:

- Bullöses Pemphigoid
- Pemphigoid gestationis
- Lineare IgA-Dermatose
- Schleimhautpemphigoid
- Lichen planus pemphigoides
- Anti-p200-/ Laminin γ1- Pemphigoid
- Anti-Kollagen-Typ-IV-Pemphigoid
- Bullöser Lupus erythematodes
- Dermatitis herpetiformis Duhring
- Epidermolysis bullosa acquisita [Schmidt & Zillikens, 2009a]

Innerhalb der Lamina lucida oder der Lamina densa der dermo-epidermalen Junktionszone entstehen pralle Blasen. Die Blasendecke wird durch die gesamte Epidermis gebildet und ist daher stabiler als beim Pemphigus [Bieber et al. 2010; Schmidt & Zillikens, 2011].

1.3 Bullöses Pemphigoid

Das bullöse Pemphigoid ist mit einer Inzidenz von jährlich 1,3- 4,0 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohnern die häufigste Blasen bildende Autoimmundermatose [Langan et al. 2008; Bertram et al. 2009; Marazza et al. 2009]. Die Inzidenz der Erkrankung steigt ab dem 60. Lebensjahr deutlich an, wobei das männliche Geschlecht häufiger betroffen ist [Jung et al. 1999] und unbehandelt einen lebensbedrohlichen Verlauf nehmen kann [Rose et al. 2007]. In der Gruppe der über 90 jährigen Männer liegt die

Inzidenz bei 40 jährlichen Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohnern [Jung et al. 1999]. Kinder sind selten betroffen (juveniles bullöses Pemphigoid) [Chimanovitch et al. 2000].

Klinisch ist das Bild durch pralle -auch hämorrhagische- Blasen am Integument gekennzeichnet (Abb. 1.2- A) [Schmidt et al. 2000a; Schmidt et al. 2011]. Die Größe der Bläschen und Blasen kann von wenigen Millimetern bis mehreren Zentimetern variieren. Prädilektionsstellen sind das untere Abdomen, die Innenseite der Oberschenkel, die Ellenbeugen und intertriginöse Areale [Zillikens et al. 1996a]. Typisch ist das Nebeneinander verschiedener Entwicklungsstadien (Bläschen- Blase- Erosionen-Krusten) [Zillikens et al. 2005].

Allen Manifestationsformen gemeinsam ist, dass sie fast immer mit Juckreiz einhergehen [Kippes et al. 1999]. Bei 15–30% der Patienten ist nur eine Körperregion betroffen und bei ca. 25% finden sich Läsionen in der Mundhöhle, selten an der Genitalschleimhaut oder den Konjunktiven. Meist sind dies Patienten, die eine hohe Krankheitsaktivität und gleichzeitig generalisierte Blasen am übrigen Integument aufweisen [Zillikens et al. 1996a, Kippes et al. 1999].

Das bullöse Pemphigoid kann auch gänzlich oder als prämonitorisches Stadium über Wochen, Monate und manchmal Jahre ohne Blasenbildung unter dem klinischen Bild eines Ekzems, einer Urtikaria oder einer Prurigo simplex subacuta verlaufen [Wever et al. 1995; Zillikens et al. 1996a; Schmidt et al. 2000a; Schmidt et al. 2011; Schmidt & Zillikens, 2011].

Histopathologisch zeigt sich im Vollbild der Erkrankung eine subepidermale Blase, deren Dach von der gesamten Epidermis gebildet wird.

Das Entzündungsinfiltrat besteht typischerweise aus Leukozyten [Jordon et al. 1985]. Die Mehrheit stellen die aktivierten T-Zellen mit einem Verhältnis CD4/CD8 von 2:1 dar, gefolgt von Monozyten/Makrophagen und Granulozyten [Ambach et al. 1992].

Die direkte Immunfluoreszenz periläsionaler Haut zeigt in praktisch allen Fällen lineare Ablagerungen von C3 und in 90% der Fälle Ablagerungen von IgG an der dermo-epidermalen Junktionszone [Zillikens et al. 1996a; Korman, 1998; Kippes et al. 1999].

In der indirekten Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut lassen sich bei 90% der Patienten mit bullösem Pemphigoid zirkulierende Autoantikörper nachweisen, die im Dach der artifiziell erzeugten Blase binden [Korman, 1998; Kippes et al. 1999] (Abb. 1.2- B).

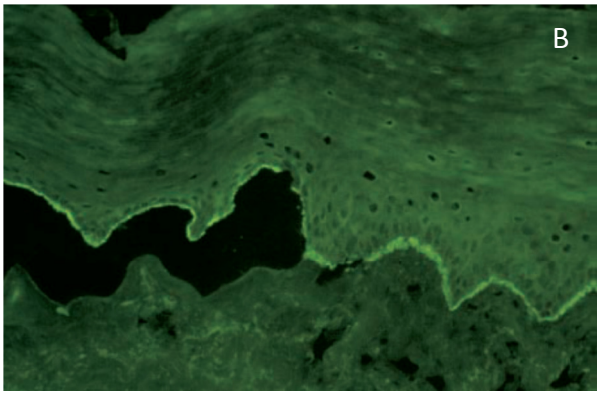

Abb. 1.2 bullöses Pemphigoid [aus: Schmidt et al. 2000a]
A: Pralle Blasen, Erosionen und Krusten an Unterarm und Ellenbeuge
B: Indirekte Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut. Typischerweise binden die IgG Antikörper auf der epidermalen Seite des artifiziellen Spaltes

Auf Affenösophagus liegt die Sensitivität der indirekten Immunfluoreszenz bei 70% [Jordon et al. 1967]. Dass der Titer der indirekten Immunfluoreszenz nicht mit der Krankheitsaktivität korreliert [Zillikens et al. 1992], ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Immunfluoreszenz-Reaktivität vor allem durch Antikörper gegen BP230 und nur zu einem geringen Teil durch Antikörper gegen BP180 vermittelt wird [Pas et al. 1995].

Primär pathogenetische Bedeutung haben jedoch Antikörper gegen BP180, die in spezifischen Immunoblot- und ELISA-Verfahren nachgewiesen werden [Labib et al. 1986; Miller et al. 1993; Ide et al. 1995; Zillikens et al. 1997a+b; Haase et al. 1998; Kippes et al. 1999]. Etwa 80% der Patienten weisen im Immunoblot auch IgA-Reaktivität mit BP180 auf, die jedoch jeweils schwächer ist als die IgG-Reaktivität [Döpp et al. 2000, Kromminga et al. 2000]. Im akuten Stadium der Erkrankung finden sich in mehr als 50% der Fälle zudem erhöhte Gesamt IgE-Spiegel, häufig auch eine periphere Eosinophilie [Bushkell & Jordon, 1983; Jordon et al. 1985; Parodi & Rebora, 1992; Schmidt et al. 1995].

Die Zielantigene des bullösen Pemphigoid, BP180 und BP230, sind Bestandteile des hemidesmosomalen Komplexes [Schmidt et al. 2011], der eine Verbindung der intermediären Zytokeratinfilamente des basalen Keratinozyten mit Strukturen der papillären Dermis vermittelt [Zillikens, 1999] (Abb. 1.1).

BP180 ist ein transmembranöses Glykoprotein mit Typ-II-Orientierung, d.h. der N-Terminus liegt intra- und der C-Terminus extrazellulär. Die Ektodomäne umfasst etwa 1.000 Aminosäuren [Giudice et al. 1992; Zillikens & Giudice, 1999]. Mit der 16. nicht-kollagenen Domäne (NC16A) und der 15. kollagenen Domäne überspannt der extrazelluläre Anteil von BP180 die Lamina lucida, während der verbleibende C-Terminus in die Lamina densa der dermo-epidermalen Junktionszone hineinreicht [Masunaga et al. 1997; Hirako et al. 1998], um dann wieder in die Lamina densa zurückzubiegen [Zillikens et al. 1997b].

Die NC16A-Domäne, die sich extrazellulär unmittelbar an die Zellmembran des basalen Keratinozyten anschließt, stellt einen immundominanten Abschnitt dar [Zillikens et al. 1997b]. Es ist die Region, gegen die bei etwa 85% der Patienten mit bullösem Pemphigoid IgG-Autoantikörper gefunden werden [Zillikens et al. 1997a]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Spiegel der Serumautoantikörper gegen BP180-NC16A mit der Krankheitsaktivität der Patienten mit bullösem Pemphigoid korrelieren [Schmidt et al. 2000a].

BP230 liegt intrazellulär und ist Bestandteil der hemidesmosomalen Plaque. Das Carboxylende bindet an Keratinfilamente, während der N-Terminus wahrscheinlich mit BP180 und der β4-Kette von dem α6β4-Integrin interagiert [Borradori & Sonnenberg, 1999].

Die gegen BP180 und BP230 gerichteten Autoantikörper beim bullösen Pemphigoid gehören vor allem der IgG_4- und der IgE-Klasse an [Döpp et al. 2000]. Antikörpern gegen BP230 kommt wahrscheinlich eine Verstärkung durch eine Entzündungsreaktion hinzu, nachdem bereits Autoantikörper gegen den extrazellulären Anteil von BP180 eine initiale Blase und möglicherweise eine Schädigung des basalen Keratinozyten verursacht haben. Der Nachweis von Autoantikörpern mit unterschiedlicher Spezifität gegen verschiedene extra- und intrazelluläre Abschnitte auf BP180 und verschiedene Epitope auf BP230 dürfte auf das Phänomen des epitope spreading zurückzuführen sein [Liu et al. 1993].

Weitere wichtige Informationen zur Pathogenese ergaben sich durch den passiven Transfer der Autoantikörper in neonatalen Mäusen [Liu et al. 1993]. Die intradermale oder intraperitoneale Injektion von Kaninchen IgG gegen ein rekombinantes Fragment

des murinen BP180 in neonatale Mäuse führte bei den Tieren zu einer bullösen Pemphigoid ähnlichen Erkrankung [Liu et al. 1995]. Weitere Untersuchungen in diesem Modell zeigen, dass Komplementaktivierung, Infiltration von Neutrophilen und Freisetzung von Proteasen am Ort der Spaltbildung eine zwingende Voraussetzung für die Auslösung des bullösen Pemphigoid sind [Liu et al. 1995; Liu et al. 1997; Liu et al. 1998].

Beim Menschen geht man davon aus, dass es nach der Bindung der Autoantikörper und Aktivierung von Komplement [Gammon et al. 1982; Naito et al. 1982], möglicherweise auch der Freisetzung von IL-8 aus Keratinozyten [Schmidt et al. 2000a], zum Einwandern von Leukozyten in die dermo-epidermale Junktionszone kommt [Jordon et al. 1985]. Deren Aktivierung und die Freisetzung von Proteasen führen schließlich zu Spalten innerhalb der ultrastrukturellen Lamina lucida [Naito et al. 1982; Jordon et al. 1985].

Das ex vivo-Modell besteht aus Kryoschitten gesunder humaner Haut, die bei Inkubation mit Patientenantikörpern durch Rekrutierung und Aktivierung von Granulozyten zu einer dermo-epidermalen Spaltbildung führt. Um eine Blasenbildung hervorzurufen, ist der Fc-Anteil der Autoantikörper notwendig [Sitaru et al. 2002a +b], wobei eine Inhibition der Gelantinase B und Elastase aus neutrophilen Granulozyten die antikörpervermittelte Spaltbildung in diesem Modell aufhebt [Shimanovich et al. 2004].

Das bullöse Pemphigoid verläuft häufig selbstlimitierend. Die Erkrankung kann sich über wenige Monate, aber auch über Jahre erstrecken [Schmidt & Zillikens, 2011]. Vor allem aufgrund des hohen Alters der Patienten ist es immer noch mit einer erheblichen Mortalität verbunden. Knapp 30% der Patienten versterben innerhalb des ersten Jahres nach der Diagnosestellung [Rzany et al. 2002].

Ältere Patienten, die mit relativ hohen Dosen systemischer Glukokortikoide behandelt werden müssen und niedrige Serumalbuminspiegel aufweisen, haben eine besonders schlechte Prognose [Rzany et al. 2002].

Bei geringer Krankheitsaktivität ist eine Therapie mit potenten topischen Glukokortikoiden häufig ausreichend [Schmidt & Zillikens, 2011]. Bei Gabe eines oralen

Glukokortikoids werden zur Einsparung von Kortikosteroiden Kombinationen mit Dapson, Azathioprin, Mycophenolat-Mofetil oder Methotrexat eingesetzt [Person & Rogers, 1977; Venning et al. 1989; Nousari et al. 1998; Schmidt & Zillikens, 2011]. Eine orale Therapie mit Tetrazyklin und Niacinamid (Nikotin-säureamid) unter zusätzlicher Anwendung eines topischen Kortikosteroids wurde ebenfalls als erfolgreich beschrieben [Fivenson et al. 1994; Hornschuh et al. 1997]. Diese Therapie wirkt eher über die Beeinflussung lokaler Entzündungsmediatoren in der Haut, als über eine Reduktion der Antikörperbildung [Hornschuh et al. 1997]. Nur selten sind hochdosierte Kortikosteroide, intravenöse Immunglobuline, Immunadsorption oder die Gabe von Rituximab erforderlich [Schmidt & Zillikens, 2011].

2 Fragestellung

Patienten mit bullösem Pemphigoid weisen Autoantikörper gegen Strukturproteine der dermo-epidermalen Junktionszone auf. Diese Proteine sind für die Adhäsion der Epidermis auf der Dermis essentiell (Abb.1.1). Daher kommt es bei Autoantikörperbildung gegen sie zur Lösung der Epidermis von der Dermis, was klinisch als Blasenbildung imponiert. In der Regel geht der bullösen Phase eine wochen- oder monatelange prämonitorische Phase voraus, die durch starken Juckreiz, unter dem praktisch alle Patienten leiden [Kippes et al. 1999], und Auftreten von ekzematösen, erythematösen oder urtikariellen Läsionen charakterisiert ist [Wever et al. 1995; Zillikens et al. 1996a; Schmidt et al. 2000a; Schmidt et al. 2011].

In der vorliegenden Arbeit haben wir daher die Hypothese überprüft, ob chronischer Juckreiz ein Risikofaktor für die Ausbildung von Autoantikörper gegen die dermo-epidermale Junktionszone darstellt.
Dem Konzept von Di Zenzo et al. [2011] folgend, könnten ständige Hautreizungen bedingt durch das Kratzen bei chronischem Juckreiz zur Beschädigung und anschließend zur Exponierung sonst verborgener Epitope auf Proteinen der dermo-epidermalen Junktionszone gegenüber dem Immunsystem führen. So könnte eine Autoimmunreaktion gegen Strukturproteine der dermo-epidermalen Junktionszone in Gang gesetzt werden.

Zur Prüfung der Hypothese wurde das Serum von Patienten mit mindestens 6 Wochen bestehenden juckenden Dermatosen auf zirkulierende Autoantikörper gegen Strukturproteine der dermo-epidermalen Junktionszone untersucht.
Zu den am häufigsten untersuchten Erkrankungen gehörten das atopische Ekzem, die Psoriasis und die Prurigo simplex subacuta.

Sollte sich die Hypothese bestätigen, könnte ein Screening auf Autoantikörper gegen die dermo-epidermale Junktionszone bei unklaren, dauerhaft juckenden Dermatosen zu einer früheren Diagnose und Therapie führen.
Außerdem läge die Vermutung nahe, dass Immunreaktionen gegen Strukturproteine der Haut durch mechanische Irritationen (Kratzen) ausgelöst werden können.

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Die 78 untersuchten Seren stammten von Patienten, die stationär oder ambulant in der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck behandelt wurden. 45% der 78 Patienten waren weiblichen und 55% männlichen Geschlechts, was etwa der Bevölkerungspopulation entspricht (Abb. 3.1- A). Der Median der Altersverteilung lag bei 67 Jahren (95% Quantile 26-89 Jahre) (Abb. 3.1- B). Alle Patienten litten an starkem Juckreiz, der seit mindestens 6 Wochen anhielt, wobei der Median bei 36 Wochen (95% Quantile 7,85-2819,70 Wochen) lag (Abb. 3.1- C). Die Patienten waren einwilligungsfähig und hatten keine Blasen bildende Autoimmundermatose.

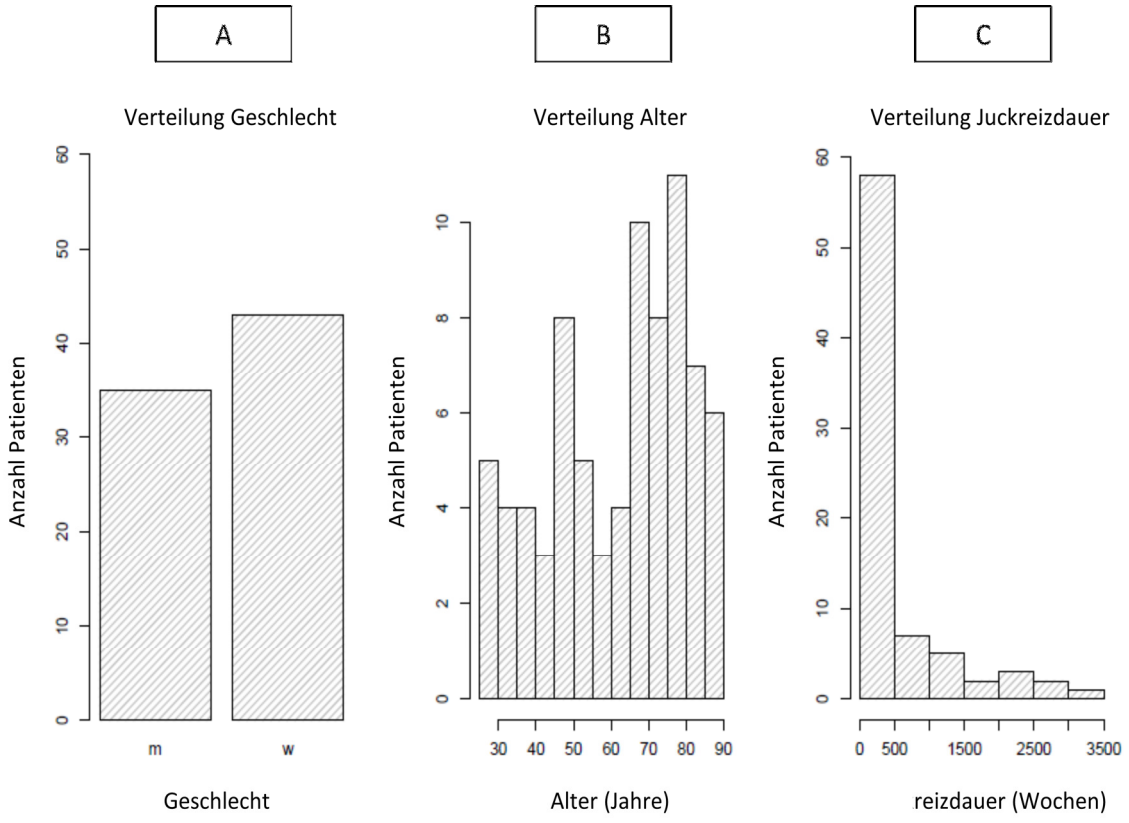

Abb.3.1: Beschreibung der Studienpopulation mittels Säulendiagrammen
m: männlich, w: weiblich

Nach Aushändigung einer schriftlichen Patienteninformation hatten die Teilnehmer die Möglichkeit offene Fragen zu klären. Darauf erfolgte, in der Regel im Rahmen der diagnostischen Blutentnahmen, eine venöse Blutentnahme von ca. 18ml. Diese wurde 3 Minuten bei 7000 U/min zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau), das Serum abpipettiert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Diagnosen wurden in folgende Gruppen unterteilt: atopisches Ekzem (n = 21, 27%), Psoriasis (n = 14, 18%), Prurigo simplex subacuta (n = 13, 17%) und andere Dermatosen (Andere; n = 31, 40%)[Leser-Trèlat-Syndrom, Pruritus sine materia, nummuläres Ekzem, Lichen ruber planus, Kontaktekzem, Arzneimittelexanthem, mikrobielles Ekzem, Tinea corporis, Exzitations-ekzem, Prurigo nodularis, Erythrodermie bei T-Zell-Lymphom, Lichen sclerosus, pruriginöses Ekzem, Stauungsdermatitis, gram negativer Fußinfekt, sonstige Prurigo]. Bei allen Patienten mit Prurigo simplex subacuta wurde vorab mittels direkter Immunfluoreszenz eine bullöse Autoimmundermatose ausgeschlossen (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Patientencharakteristika

Patient (Nummer)	Alter (Jahre)	Geschlecht	Juckreizdauer (Wochen)	Diagnose
1	73	w	52	Leser-Trèlat-Syndrom
2	81	w	16	Pruritus sine materia
3	67	w	520	nummuläres Ekzem
4	54	w	20	Lichen ruber planus
5	38	m	1040	atopisches Ekzem
6	67	m	24	Kontaktekzem
7	80	m	286	Prurigo simplex subacuta
8	29	w	8	atopisches Ekzem
9	73	w	28	Arzneimittelexanthem
10	86	w	6	nummuläres Ekzem
11	79	m	8	Prurigo simplex subacuta
12	57	m	312	atopisches Ekzem
13	32	m	24	mikrobielles Ekzem
14	77	m	6	Tinea corporis
15	55	w	312	Exzitationsekzem
16	80	m	28	Exzitationsekzem
17	47	m	1040	atopisches Ekzem
18	69	w	36	Lichen ruber planus
19	79	m	24	Psoriasis
20	28	w	24	atopisches Ekzem

Patient (Nummer)	Alter (Jahre)	Geschlecht	Juckreizdauer (Wochen)	Diagnose
21	87	w	12	Prurigo nodularis
22	89	w	12	Erythrodermie bei T-Zell-Lymphom
23	49	w	40	atopisches Ekzem + Psoriasis
24	48	w	1300	Prurigo simplex subacuta
25	48	m	780	Psoriasis
26	75	w	28	Lichen sclerosus
27	89	w	78	Psoriasis
28	86	m	12	Arzneimittelexanthem
29	69	w	52	Pruriginöses Ekzem
30	85	w	24	Exzitationsekzem
31	33	m	24	atopisches Ekzem
32	42	w	8	Pruriginöses Ekzem
33	76	w	260	Pruriginöses Ekzem
34	49	m	104	Prurigo simplex subacuta
35	66	w	16	atopisches Ekzem
36	63	m	12	Psoriasis
37	41	w	520	Psoriasis
38	64	m	520	Stauungsdermatitis
39	78	w	104	atopisches Ekzem
40	63	m	24	nummuläres Ekzem
41	84	w	24	Psoriasis
42	72	m	520	Psoriasis
43	54	w	338	Psoriasis
44	68	w	208	Psoriasis
45	26	m	416	Psoriasis
46	32	w	624	Psoriasis
47	46	m	9	gram negativer Fußinfekt
48	44	m	8	Prurigo nodularis
49	77	w	8	Arzneimittelexanthem
50	68	w	2080	Prurigo nodularis
51	39	m	1040	atopisches Ekzem
52	26	m	520	atopisches Ekzem
53	47	m	2444	atopisches Ekzem
54	67	w	3484	atopisches Ekzem
55	54	m	2808	atopisches Ekzem
56	57	m	2964	atopisches Ekzem
57	38	m	1976	atopisches Ekzem
58	33	m	1716	atopisches Ekzem
59	25	m	1300	atopisches Ekzem
60	82	w	8	Prurigo sine materia
61	73	m	12	Psoriasis
62	53	w	182	Psoriasis
63	82	w	12	atopisches Ekzem

Patient (Nummer)	Alter (Jahre)	Geschlecht	Juckreizdauer (Wochen)	Diagnose
64	50	w	22	nummuläres Ekzem
65	66	m	78	Prurigo simplex subacuta
66	37	w	52	Prurigo simplex subacuta
67	60	w	12	Prurigo simplex subacuta
68	77	m	12	Prurigo simplex subacuta
69	76	w	24	Prurigo simplex subacuta
70	72	m	130	atopisches Ekzem
71	89	w	24	Prurigo simplex subacuta
72	84	w	16	Stauungsdermatitis
73	66	w	24	sonstige Prurigo
74	75	w	16	Arzneimittelexanthem
75	63	m	12	Prurigo simplex subacuta
76	77	m	260	atopisches Ekzem
77	75	w	2080	Prurigo simplex subacuta
78	85	w	36	Prurigo simplex subacuta

m: männlich, w: weiblich

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck am 08.09.2008 positiv beurteilt. (Nr.: 08-128)

3.2 Negative Kontrollseren

Als Negativkontrollen dienten Seren von gesunden Blutspendern.

3.3 Antikörper

Tabelle 3.2.: angewandte Antikörper

Blot	Bezeichnung	Typ	Verdünnung	Funktion
ECM	Laminin α-3 (H-187) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)	Rabbit Polyclonal IgG (HRP)	1 : 1.000	Primär-AK
	Laminin β-3 (H-300) (Santa Cruz Biotechnology)	Rabbit Polyclonal IgG (HRP)	1 : 100 000	Primär-AK
	Laminin β-3 (H-300) (Santa Cruz Biotechnology)	Rabbit Polyclonal IgG (HRP)	1 : 200 000	Primär-AK
	Laminin ɤ-2 (E6) (Santa Cruz Biotechnology)	Mouse Monoclonal IgG_1 (HRP)	1 : 100 000	Primär-AK
	Laminin ɤ-2 (E6) (Santa Cruz Biotechnology)	Mouse Monoclonal IgG_1 (HRP)	1 : 200 000	Primär-AK
	NHS, PK, Pat.	Patientenserum	1 : 50	Primär-AK
	Anti-Rabbit (Dako, Glostrup, Dänemark)	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunglobulins (HRP)	1 : 1.000	Sekundär-AK
	Anti-Mouse (Dako)	Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulins (HRP)	1 : 1.000	Sekundär-AK
	IgG_4 (Dako)	Mouse Anti-Human IgG_4 (HRP)	1 : 300	Sekundär-AK
KCE	Desmoplakin 1 & 2 (ProGen Biotechnik, Heidelberg)	Mouse Monoclonal IgG_{2b} (HRP)	1 : 50	Primär-AK
	Envoplakin		1 : 1.000	Primär-AK
	Periplakin		1 : 1.000	Primär-AK
	PNP	Patientenserum	1 : 50	Primär-AK
	PK (BP 180 / BP 230), NHS, Pat.	Patientenserum	1 : 50	Primär-AK
	R 136	Rabbit	1 : 1.000	Primär-AK
	r BP 230	Rabbit	1 : 200	Primär-AK
	Anti-Mouse (Dako)	Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulins (HRP)	1 : 500	Sekundär-AK
	Anti-Rabbit (Dako)	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunglobulins (HRP)	1 : 1.000	Sekundär-AK
	Anti-Rabbit (Dako)	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunglobulins (HRP)	1 : 500	Sekundär-AK
	IgA (Dako)	Polyclonal Rabbit Anti-Human (HRP)	1 : 300	Sekundär-AK

Blot	Bezeichnung	Typ	Verdünnung	Funktion
LAD-1	PK, NHS, Pat.	Patientenserum	1 : 100	Primär-AK
	PK, NHS, Pat.	Patientenserum	1 : 20	Primär-AK
	IgG (Dako)	Polyclonal Rabbit Anti-Human (HRP)	1 : 500	Sekundär-AK
	IgA (Dako)	Polyclonal Rabbit Anti-Human (HRP)	1 : 50	Sekundär-AK
DE	PK-p200, PK-EBA, NHS, Pat.	Patientenserum	1 : 50	Primär-AK
	IgG_4 (Dako)	Mouse Anti-Human IgG_4 (HRP)	1 : 300	Sekundär-AK
NC16A	PK, NHS, Pat	Patientenserum	1 : 20	Primär-AK
	IgA (Dako)	Polyclonal Rabbit Anti-Human (HRP)	1 : 50	Sekundär-AK
IIF	Basalmembran-fluoreszenz (BD)	Patientenserum	1 : 10	Primär-AK
	EBA (BB)	Patientenserum	1 : 1.000	Primär-AK
	PK, Pat.	Patientenserum	1 : 10	Primär-AK
	IgG (Bio-Rad Laboratories, München)	Anti-Human (F.I.T.C.)	1 : 100	Sekundär-AK
	IgA (Bio-Rad Laboratories)	Anti-Human (F.I.T.C.)	1 : 100	Sekundär-AK

ECM: extrazelluläre Matrix, HRP: horseradish –Meerrettichperoxidase, AK: Antikörper, NHS: normales humanes Serum, PK: Positivkontrolle, Pat.: Patient, KCE: Keratinozytenextrakt, PNP: Paraneoplastischer Pemphigus, LAD-1: Lineare-IgA-Dermatose Antigen 1, DE: dermales Extrakt, PK-p200: Positivkontrolle mit p200-Antigen, PK-EBA: Positivkontrolle mit Epidermolysis bullosa acquisita, IIF: indirekte Immunfluoreszenz, BD: Blasendach, BB: Blasenboden, F.I.T.C.: Fluoresczin-Isothiocyanat
Dargestellt sind die verwendeten Blot mit den eingesetzten Primär- und Sekundär-Antikörpern.

3.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Durch die indirekte Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut gelang der Nachweis von Antikörpern im Serum der Patienten gegen Bestandteile der dermo-epidermalen Junktionszone. Die Induktion eines subepidermalen Spaltes erfolgte mittels Inkubation humaner Haut in 1M NaCl- Lösung (Roth, Karlsruhe), anschließend die Anfertigung von Gefrierschnitten dieses Präparats und deren Inkubation mit Primärantikörpern für 30 Minuten im Brutschrank (Heraeus, Hanau). Die sekundären Antikörper (Bio-Rad, München) waren an Fluoreszin-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt, dadurch ließen sich die gebundenen Antikörper an der dermo-epidermalen-Junktionszone im Fluoreszenz-mikroskop (Olympus BX40, Hamburg) nachweisen. [Gammon et al. 1984; Kelly & Wojnarowska, 1988; Zillikens et al. 1996b]

3.5 Enzymed-linked immuno sorbent-assay (ELISA)

ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen BP180-NC16A und BP230 wurden nach den Angaben der Hersteller (Euroimmun, Lübeck und MBL, Medical & Biological, Nagoya, Japan) durchgeführt.

3.6 Kultur von HaCaT-Keratinozyten

Die Resuspension in einer T75 Zellkulturflasche (Sarstedt, Nümbrecht) der primär in Stickstoff eingefrorenen HaCaT(Human adult low Calcium high Temperature)-Zellen (Prof. N. E. Fusenig, DKFZ Heidelberg) [Boukamp et al. 1988] schloss sich sekundär im vorgewärmten Keratinozytenmedium (KGM+, Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien) an. In die Zellkulturflaschen wurden Vitamin C (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim), EDTA (Roth) und Phenylmethylsulfonyl-Flourid (PMSF, AppliChem, Darmstadt) supplementiert. Die Lösung der Adhäsionskultur erfolgte mittels Trypsin (CCP, Oberdorla); fetales Kälberserum (FBS, Biochrom, Berlin) bewirkte die EDTA-Neutralisation. Die Kultivierung geschah im Begasungsbrutschrank (Heraeus) bei 37°C und 4,9% CO_2. Um die Konfluenz der Zellen und die möglichen Kontaminationen zu

beurteilen, wurden die Zellkulturen täglich mikroskopisch begutachtet. Nach der Pelletierung der Zellen konnten sie in einem Einfriermedium aus 60% Keratinozytenmedium (KGM+, Cambrex Bio Science), 30% fetalem Kälberserum (FBS, Biochrom) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich Chemie) konserviert werden. [Kneisel & Hertel, 2011]

3.7 Gewinnung von Zellkulturüberstand konditionierter kultivierter HaCaT-Keratinozyten zur Herstellung der löslichen extrazellulären Domäne von BP180 (LAD-1)

Zur Pelletierung erfolgte die Versetzung und Zentrifugation (90min, 4°C, 16.000g) (Megafuge 1.0, Heraeus) des Keratinozytenüberstandes nach Herstellung einer HaCaT-Kultur mit 30%igem Ammoniumsulfat (Sigma-Aldrich Chemie). Lösung und Resuspension entstandener Pellets fand mit einer Tablette complete mini (Roche, Mannheim), die Dialyse mit PBS (Phosphate buffered saline) bestehend aus NaCl 0,9% (Roth), Kaliumchlorid (KCl, Merck, Darmstadt), Natrium-dihydrogenphosphat (Na_2HPO_4, Merck), Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4, Merck) und Aqua dest. (Apotheke UKSH, Campus Lübeck) (pH 7,2), statt. Das Dialysat wurde mit 5fach-SDS-Probenpuffer bestehend aus 1,5M Tris (pH 6,8) (Merck), Glycerol (AppliChem), Sodiumdodecylsulfat (SDS, Merck), Aqua dest. (Apotheke UKSH), 0,2% Bromphenol (Roth) (0,2g/ 100ml Ethanol (Apotheke UKSH)) und ß-Mercaptoethanol (Merck) versetzt, gekocht (5min, 96°C) (Blockthermostat BT5320, Eppendorf AG, Hamburg), aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80^{o}C eingefroren.

LAD-1 konnte mit Hilfe des sekundären Antikörpers (Polyclonal Rabbit Anti-Human (HRP) (Dako), Verdünnungen IgG 1:500, IgA 1:50) im Immunoblot nach 2,5 bis 3 Minuten nachgewiesen werden. [Marinkovich et al. 1996; Motoki et al. 1997]

3.8 Expression von GST-BP180-NC16A und GST

Die Herstellung der Primärkultur kam aus der Beimpfung des LB Mediums (MP Biomedicals Europe, llkirch, Frankreich) und Carbencillin (Roth) mit E-coli-Zellen (eigene Herstellung aus DH5α [Zillikens et al. 1997b]) in einem Falcon-Röhrchen (Sarstedt) zustande, wobei das Antibiotikum der Plasmidstabilisierung diente. Das Medium wurde bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}, Bio Photometer (RS 232C), Eppendorf) von 0,6 bei 37°C und 220rpm (Schüttler Certomat IS, B. Braun, Melsungen) inkubiert. Die Erzeugung der Sekundärkultur unter Zugabe von 1M Isopropyl-β_D-Thiogalacto-Pyranoside (IPTG, Roth) einschließlich folgender Inkubation schloss sich an. Nach Zentrifugation (10min, 4°C, 2.000g) (Megafuge 1.0, Heraeus) eliminierte man den Überstand, verwarf diesen, um die verbleibende Sekundärkultur mit einer Tablette complete mini (Roche) zu resuspendieren. Die rekombinanten Proteine von E. coli lagerten sich als lösliches zytoplasmatisches Protein innerhalb der Zelle ab, deshalb war zur Isolierung der Proteine die Lyse der Bakterienzellen notwendig. Um das Protein separieren zu können, mussten die gelösten Pellets in ein Falcon-Röhrchen (Sarstedt) gegeben und auf Eis mit 100% Power, 3x 20 Schlägen sonikiert (BANDELIN, Berlin) werden. Der abzentrifugierte Überstand, in dem sich unter anderem das Protein befand, wurde abpipettiert. [Zillikens et al. 1997a]

Glutation-S-Transferase nutzte man zur weiteren Verwendung unaufgereinigt, Glutation-S-Tranferase-NC16A aufgereinigt über einer Gluthationsäule (Gluthation-Matrix, Sigma-Aldrich Chemie) [Zillikens et al. 1997b; Schmidt et al. 2000a].

Die Eliminierung schwach gebundener und kontaminierter Proteine von der Säule ging durch Waschung mit PBS vonstatten. Die Gewinnung der Proteine aus der Membran erforderte den Einsatz von 1% Triton X (Sigma-Aldrich Chemie) [Helenius & Simons et al. 1975]. Nach photometrischer Kontrolle (280nm) des erhaltenen Extraktes, Sammlung und Kochen (5min, 96°C) (Blockthermostat BT5320, Eppendorf AG), erfolgte das Einfrieren bei -80^{o}C bis zur weiteren Verwendung.

Mit Hilfe des Sekundärantikörpers (Polyclonal Rabbit Anti-Human (HRP) (Dako), Verdünnung 1:300) konnte die entsprechende Bande in einer Zeitspanne von 8 bis 20 Sekunden nachgewiesen werden. [Zillikens et al. 1997a; Hata et al. 2000; Sitaru et al. 2007]

3.9 Herstellung von Keratinozytenextrakt (KCE)

Der Überstand der HaCaT-Zellen (Prof. N. E. Fusenig), befindlich in T-175cm²-Zellkulturflaschen (Sarstedt), wurde verworfen, anschließend das Extrakt mit 5fach-SDS Probenpuffer gelöst, in Eppendorf-Gefäßen gesammelt, gekocht (5min, 96°C) (Blockthermostat BT5320, Eppendorf AG) und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Mit Hilfe des Sekundärantikörpers (Polyclonal Rabbit Anti-Human (HRP) (Dako), Verdünnung 1:300) konnte das native BP180 nach 1 bis 1,5 Minuten nachgewiesen werden. [Schäcke et al. 1998]

3.10 Herstellung von Extrakt aus humaner Dermis (DE)

Die Gewinnung des Extraktes, wie bei Zillikens [et al. 1996b] beschrieben, erfolgte aus frischer humaner Haut.

Zum Nachweis von EBA(290kDa)- und p-200(200kDa)-Banden ist die Herstellung des dermalen Extraktes notwendig. Dazu musste, nach Entfernung der Subkutis, die Kutis in eine Lösung von 1M NaCl (Roth), 5mM EDTA (Roth), 1mM Phenylmethylsulfonyl-Flourid (PMSF, Appli Chem) (oder 1mM 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl-Fluoride AEBSF (Sigma-Aldrich Chemie)) und PBS in ein Becherglas 3Tage bei 4°C einlegt werden. Nachdem die Epidermis abgezogen, die verbliebene Dermis in ca. 2cm x 2cm große Stücke geschnitten und in eine Apparatur (Eigenbau) eingespannt wurde, konnte pro freigelassenes Hautstück 500µl Puffer A bestehend aus 12,5mM Tris pH 6,8 (Merck), 4M Harnstoff (Roth), 5mM EDTA (Roth), AEBSF (Sigma-Aldrich Chemie) und Aqua dest. (Apotheke UKSH) aufpipettiert werden. Nach 10min konnte dieser Puffer verworfen, je 350µl Puffer B aus 12,5 mM Tris pH 6,8 (Merck), 9M Harnstoff (Roth), 2% Sodiumdodecylsulfat (SDS, Merck), 10% ß-Mercaptoethanol (Merck), 5mM EDTA (Roth), 1mM AEBSF (Sigma-Aldrich Chemie) und Aqua dest. (Apotheke UKSH) für eine Stunde aufgegeben werden. Das nun entstandene dermale Extrakt (DE) wurde mit 5fach SDS-Proben-Puffer im Verhältnis 4:1 ergänzt, gekocht (5min, 96°C)

(Blockthermostat BT5320, Eppendorf AG) und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Anschließend erlaubte die Zugabe vom Sekundärantikörper (Mouse Anti-Human IgG_4 (HRP) (Southern Biotech, Birmingham, USA), Verdünnung 1:300) die Darstellung der spezifischen Banden, wobei die Zeitspanne zwischen 2 bis 9 Minuten betrug [Zillikens et al. 1996b].

3.11 Herstellung eines Extraktes der extrazellulären Matrix kultivierter HaCaT-Keratinozyten zum Nachweis von Anti- Laminin 332 Reaktivität (ECM)

Nach Inkubation der HaCaT-Zellen (Prof. N. E. Fusenig) in T-175cm²-Zellkulturflaschen (Sarstedt) mit Ammoniumhydroxid-Lösung aus 33% Ammoniumhydroxid (Sigma-Aldrich Chemie) und Aqua dest. (Apotheke UKSH)) lösten sich die Zellen ab und die ECM konnten mit Hilfe von 5fach-SDS-Probenpuffer in Eppendorf-Gefäßen gesammelt werden. Das Extrakt wurde dann gekocht (5min, 96°C) (Blockthermostat BT5320, Eppendorf AG) und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Laminin 332 konnte mit Hilfe des sekundären Antikörpers (Mouse Anti-Human IgG_4 (HRP) (Dako), Verdünnung 1:300) in der Dunkelkammer detektiert werden. Die Zeitspannen der Entwicklung lagen zwischen 1 Sekunde und 8 Minuten. [Stanley et al. 1981; Basset-Séguin et al. 1990; Durkin et al. 1997; Leverkus et al. 1999; Lazarova et al. 2004]

3.12 Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse der Proben mit Hilfe der hergestellten Extrakte konnte die Sodium-dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli [1970] genutzt werden.

Nach Laborstandard kamen zwei verschiedene Zusammensetzungen zur Anwendung:

ECM, KCE, LAD-1, NC16A		Sammelgel 4 %	Trenngel 7,5%
Aqua dest.	Apotheke UKSH	3,1ml	4,15ml
0,5M Tris pH 6,8		700µl	
1,5M Tris pH 8,8			1,35ml
30% Acrylamid-bis (49:1)	Appli Chem	650µl	2,5ml
100% Glycerol	Appli Chem	250µl	500µl
0,5M EDTA pH 8,0	Roth	40µl	
1M Glycin	Roth		1ml
10% SDS	Merck	200µl	,400µl
Temed	Roth	12µl	12µl
10% APS	Sigma	100µl	150µl

DE		Sammelgel 4 %	Trenngel 6%
Aqua dest.	Apotheke UKSH	2,1ml	2,65ml
0,5M Tris pH 6,8		700µl	
1,5M Tris pH 8,8			1,35ml
30% Acrylamid-bis (49:1)	Appli Chem	650µl	2ml
100% Glycerol	Appli Chem	1,25ml	2,5ml
0,5M EDTA pH 8,0	Roth	40µl	
1M Glycin	Roth		1ml
10% SDS	Merck	200µl	400µl
Temed	Roth	12µl	12µl
10% APS	Sigma	100µl	150µl

3.13 Proteintransfer

Der Elektrotransfer der Proteine aus den Extrakten erfolgte auf einer Nitrocellulose-membran (Whatman, Dassel) in einer Tankblotkammer (Bio-Rad, München). Die Wahl des Proteinmarkers fiel auf den Bench Mark TM Protein Ladder (Invitrogen, Karlsruhe), der standardisiert eingesetzt, 15 Banden zwischen 10kDa und 220kDa aufweist. Der Laufpuffer bestand aus Tris Base (Merck), Glycin (Roth), Sodiumdodecylsulfat (SDS, Merck), Aqua dest. (Apotheke UKSH) und der folgende Transfer-Puffer aus Methanol

(Apotheke UKSH), 10fach Tris Glycin (Merck), Aqua dest. (Apotheke UKSH). Der Transfer erfolgt über Nacht bei 30V und 300mA (Netzgerät Power Supply EPS 3500, Pharmacia, Ratingen) oder innerhalb von einer Stunde auf Eis mit 30V und 3,5A (Netzgerät Power Supply EPS 3500, Pharmacia).

Dem Transfer schloss sich eine unspezifische Detektion der Proteine durch Fast Green Lösung zusammengesetzt aus Fast Green (Merck), Methanol (Apotheke UKSH), Essigsäure (Roth) und Aqua dest. (Apotheke UKSH) an. [Towbin et al. 1992]

3.14 Immunoblot

Die in Streifen geschnittene Nitrozellulosemembranen (Whatman) wurden in Blocking-Puffer aus Magermilchpulver (Merck) und TBS bestehend aus Tris-Base (Merck), Natriumchlorid (NaCl, Roth), Aqua dest. (Apotheke UKSH), pH 7,5 inkubiert, dann mit dem Primärantikörper und später mit dem Sekundärantikörper in Inkubations-Puffer aus Magermilchpulver (Merck), BSA (Roth) und TBS aus Tris-Base (Merck), Natrium-chlorid (NaCl, Roth), Aqua dest. (Apotheke UKSH), pH 7,5 in Kontakt gebracht. Für den LAD-1 Blot setzte sich der Inkubationspuffer ohne Zugabe von Magermilchpulver (Merck) zusammen.
Zwingend erwies sich die nächtliche Blockung des BP180-NC16A-Blot statt der üblichen Stunde; der Blocking-Puffer enthielt zusätzlich BSA (Roth). Zeitgleich präabsorbierten die Seren in 1% BSA (Roth), GST und TBST aus Tris-Base (Merck), NaCl (Roth), Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemie), Aqua dest. (Apotheke UKSH), pH 7,5 ebenfalls über Nacht. [Khyse-Andersen, 1984; Zillikens et al. 1997b]

3.15 Detektion

3.15.1 Diamino-benzidintetrahydrochlorid (DAB)

Das an den Zweitantikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) erzeugte in Anwesenheit seines Substrates eine Farbreaktion. Dazu musste eine DAB-Puffertablette (Merck) in 10ml Aqua dest. (Apotheke UKSH) gelöst und kurz vor

Einbringen der Membranen in die Lösung, 20µl Wasserstoffperoxid (Merck) hinzugegeben werden. Die Ermittlung der Zeitspannen, in denen sowohl Positiv-, als auch Negativkontrollen (NHS- normales humanes Serum) visuell nachweisbar waren, trat primär, die Detektion der Patientenseren zusammen mit neuen Positiv- und Negativ-Kontrollen sekundär für den gleichen Zeitraum ein. [Green et al. 1989]
Dieses Vorgehen war bei BP180-NC16A-, BP180-LAD-1-, Keratinozytenextrakt- und dermalem Extrakt-Blot indiziert.

3.15.2 Enhanced Chemoluminescence

Die Fixierung der Membranen auf einer Klarsichtfolie und die Aufpipettierung der enhanced Chemoluminescence Lösung (Lösung A & Lösung B, ECL-Plus, Healthcare, Buckinghamshire, England) in lichtgeschützte Eppendorfgefäße (Eppendorf AG) fand vor der Detektion statt. Diese Lumineszenz basiert auf der katalytischen Umsetzung des im Reagenz enthaltenen Luminols durch die am Sekundärantikörper gekoppelte HRP, sie kann durch Exposition auf einem Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare Europe GmbH, München) detektiert werden. [Kricka et al. 1987]

3.16 Statistik

Diagramme und Statistiken wurden mittels „Gnu R“ (URL: http://www.r-projekt.org) erstellt. Für Venn-Diagramme wurde das Zusatzpaket „gplots“ verwendet.
Zur Testung eines Zusammenhangs zwischen zwei kategorialen Variablen kam der Fisher’s exact Test zum Einsatz, wobei als Effektgröße die Odds Ratio verwendet wurde. Eine logistische Regression mittels generalisierter linearer Modelle (GLM) wurde vorgenommen, um zu prüfen, ob ein positives Ergebnis in einem der Testverfahren von mehreren Faktoren (Alter, Diagnose, Geschlecht, Juckreizdauer) abhängig war. Ausgehend von einem gesättigten Modell wurden bei diesen überprüft, ob sich das Modell nach sukzessiver Entfernung von Faktoren signifikant (Likelihood-Ratio Test) verschlechterte. Zusätzlich wurde hiermit überprüft, ob eine Diskretisierung kontinuierlicher Faktoren wie Alter und Juckreizdauer die Vorhersagequalität des Modells verbessern kann. Als einfachste Form der

Diskretisierung einer kontinuierlichen Zufallsvariable X in eine diskrete (logische) Zufallsvariable Y wurde einfach ein Größenvergleich Y = X > Median(X) vorgenommen.
Nach Optimierung des Modells wurden die Effektschätzer (Odds Ratio) der einzelnen Faktoren untersucht. Für die logarithmierte Odds Ratio wurde ein 95% Konfidenzintervall berechnet; zusätzlich wurde ein p-Wert dafür berechnet, dass die logarithmierte Odds Ratio nicht Null ist.

4 Ergebnisse

Das Patientenklientel dieser Arbeit bestand aus 78 Personen mit chronisch-juckenden Dermatosen, es konnten Autoantikörper charakterisiert werden, die für subepidermal Blasen bildende Autoimmundermatosen typisch sind. Im Immunoblot wurde nach BP180 (im Keratinozytenextrakt), LAD-1 (=lineare-IgA-Dermatose Antigen 1, was der löslichen Ektodomäne von BP180 entspricht [Hirako et al. 1998, Hirako et al. 2003, Nishie et al. 2010]), BP180-NC16A (NC16A), Kollagen VII (im dermalen Extrakt) und Laminin 332 (im Extrakt extrazellulärer Matrix kultivierter humaner Keratinozyten) gesucht. Die Ermittlung von Antikörper gegen BP180-NC16A und BP230 geschah außerdem mit Hilfe von ELISA, die Antikörper auf humaner Spalthaut mittels indirekter Immunfluoreszenz. (Abb. 1.1)

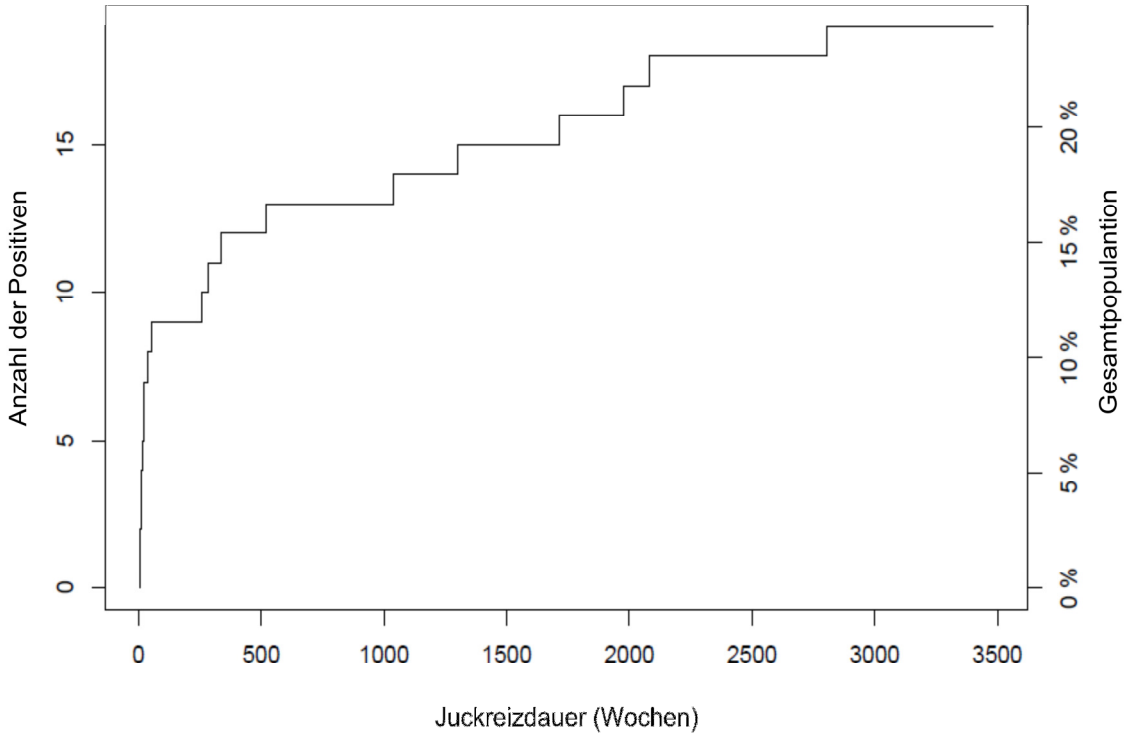

Abb. 4.1: Kurve der positiv getesteten Personen in Abhängigkeit von der Juckreizdauer
Auf der linken Ordinate ist die Anzahl der positiv getesteten Patienten (n = 18), auf der rechten Ordinate sind diese bezogen auf die Gesamtpopulation aller Untersuchten (23,1%) aufgetragen; die jeweilige Juckreizdauer der einzelnen Patienten in Wochen ist auf der Abszissenachse dargestellt. Die Kurve entspricht der Summe der positiv Getesteten, da die Anzahl der bisherigen zu den neuaufgetretenen addiert wurden, somit entspricht jede Stufe einer weiteren Person. Die Kurve zeigt an, wie viele Personen in Abhängigkeit von der Juckreizdauer positiv getestet wurden.

Nach 1.000 Wochen sind 2/3 der Patienten auf eines der angewandten Verfahren positiv erfasst. Danach nimmt die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses stark ab. Der Schnitt wurde bei 1.000 Wochen gesetzt (Abb. 4.1).

4.1 Indirekte Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut

Bei den Patienten Nummer 11 und 63 (2,6%) konnte bei IgG als Zweitantikörper eine lineare Fluoreszenz an der epidermalen Seite der Spalthaut nachgewiesen werden (Abb.4.2), die direkte Immunfluoreszenz periläsionaler Haut konnte nur bei dem Patienten Nummer 11 mit negativem Ergebnis bestimmt werden.

IgA Ablagerungen an der dermo-epidermalen Junktionszone ließen sich in der indirekten Immunfluoreszenz nicht darstellen.

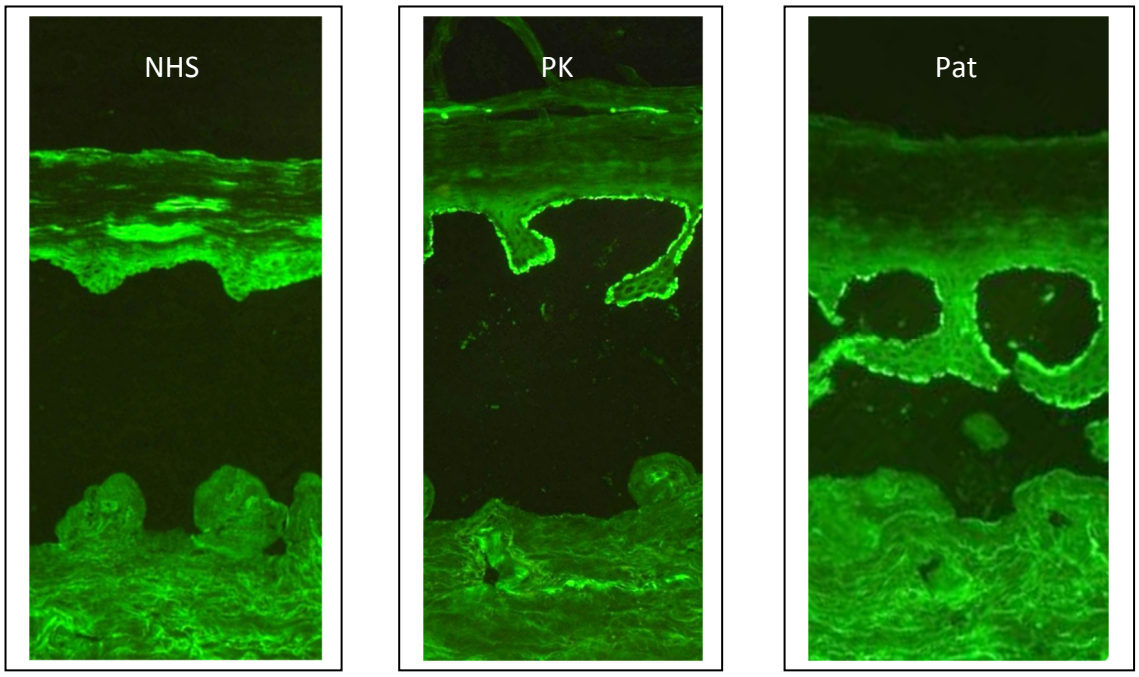

Abb. 4.2 Indirekte Immunfluoreszenz -> humane Spalthaut (200fache Vergrößerung)
Negativkontrolle (NHS = normales humanes Serum), Positivkontrolle (PK), positiver Patient (Pat)
Am Blasendach der Positiven (PK, Pat) ist eine lineare Fluoreszenz auf der epidermalen Seite des Spaltes zu erkennen.

4.2 BP180- NC16A und BP230 ELISA

ELISA-Kits unterschiedlicher Firmen kamen zum Einsatz. Die Nachweisgrenzen lagen für die Euroimmun-ELISA bei ≥20 RE/ml (BP180-NC16A & BP230), den MBL-ELISA-BP180-NC16A bei ≥9 U/ml und den MBL-BP230-ELISA bei ≥10 U/ml.

Die meisten positiven Ergebnisse in Bezug auf alle Testergebnisse ergaben sich beim *ELISA BP180-NC16A* der Firma *MBL* (n = 6; 7,7%, Nr. 50, 54, 57, 59, 63, 66), gefolgt vom *ELISA BP180-NC16A* der Firma *Euroimmun* (n = 5; 6,4%, Nr. 24, 28, 54, 63, 66), wobei bei drei Patienten (3,8%, Nr. 54, 63, 66) Übereinstimmung existierte. (Abb. 4.3)
Vier dieser Patienten (Nr. 54, 57, 59, 63) litten unter einem atopischen Ekzem, zwei (Nr. 24, 66) verband die Diagnose Prurigo simplex subacuta, während bei zwei Patienten (Nr. 28, 50) andere Dermatosen die Ursache des Juckreizes bildeten.

Der *ELISA BP230-MBL* zeigte drei positive (3,8%, Nr. 30, 60, 63), der *ELISA BP230-Euroimmun* nur ein positives Ergebnis (1,3%, Nr. 63), das sowohl mit dem anderen ELISA-Anbieter, als auch mit den BP180-NC16A-ELISA beider Firmen analog war (Abb. 4.3).
Bei zwei dieser Patienten (Nr. 30, 60) wurden andere Dermatosen diagnostiziert, Patient Nummer 64 litt unter einem atopischen Ekzem.
Fünf der positiv getesteten Probanden war ein Negativbefund periläsionaler Haut in der direkten Immunfluoreszenz gemein, bei den anderen fünf gab es keine Untersuchung.

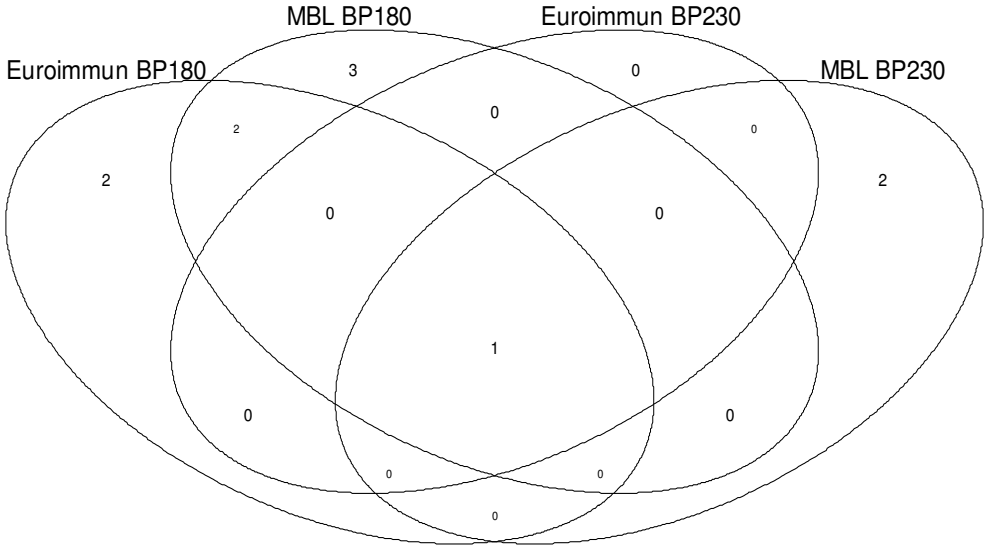

Abb. 4.3 Venn-Diagramm der ELISA:
Dargestellt ist der Zusammenhang der verschiedenen ELISA-Verfahren, wobei die Summe innerhalb einer Ellipse den Anteil der positiven Ergebnisse des Testsystems ergibt.

Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Zusammenhänge bezüglich der beiden untersuchten Autoantikörper, es schlossen sich weitere Analysen -gesplittet in Hersteller und Strukturprotein- an.

Der *MBL-BP180-NC16A-ELISA* zeigte bei sechs Patienten positive Ergebnisse, wovon vier eine Juckreizdauer über 1.000 Wochen aufwiesen, was eine Signifikanz darstellt (Tab. 4.1).

Ein signifikanter Zusammenhang bestand zwischen Autoantikörpern bei Patienten mit höherem Lebensalter (oberhalb des Medians von 67Jahren) und positiven Ergebnissen sowohl im *Euroimmun-BP180-NC16A-ELISA* (Tab. 4.1), als auch im *MBL-BP230-ELISA* (Tab.4.1).

Bei dem *Euroimmun-BP230-ELISA* konnte kein signifikanter Einfluss zwischen positiven Ergebnissen und einem der definierten Faktoren (Alter, Geschlecht, Juckreizdauer, Diagnose) festgestellt werden (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: Darstellung der signifikanten Zusammenhänge der ELISA mithilfe von p-Werten

	Komponenten	p-Wert		Komponenten	p-Wert
BP180 MBL	Patient positiv → Juckreiz >1.000	0.0121	**BP230 EU**	Patient positiv → Alter >Median	0.2368
BP180 EU	Patient positiv → Alter >Median	0.0359		Patient positiv → Geschlecht	0.3874
BP230 MBL	Patient positiv → Alter >Median	0.0386		Patient positiv → Juckreiz >1.000	0.6240
				Patient positiv → Diagnose	0.2361

MBL: Medical & Biological Laboratories, EU: Euroimmun
Seitlich sind die jeweils geprüften Testsysteme aufgeführt. Die Komponenten geben die in Beziehung stehenden Parameter (Alter >Median, Geschlecht, Diagnose, Juckreiz >1.000 Wochen jeweils oder kombiniert) in Bezug auf positive Ergebnisse an, wobei Geschlecht und Diagnose nicht weiter definiert sind. P-Werte unter 0,05 sind in rot gekennzeichnet signifikant.

4.3 Immunoblot mit Überstand kultivierter humaner Keratinozyten (LAD-1)

In dieser Untersuchung zeigte die IgG und IgA Reaktivität gegen die 120 kDa schwere lösliche Ektodomäne von BP180 (LAD-1).

Dabei reagierten vier Patienten im Blot gegen IgA (5,1%, Nr. 12, 38, 45, 76) und zwei gegen IgG (2,6%, 71, 74) als Zweitantikörper.

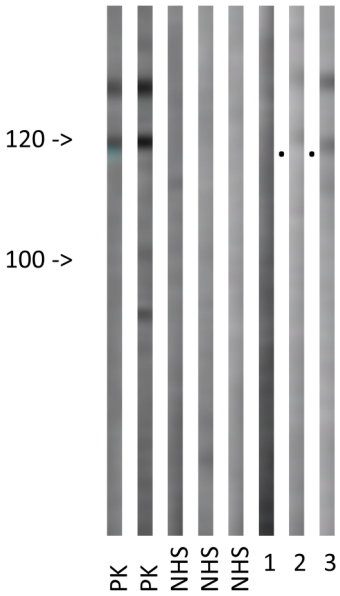

Abb. 4.4: Immunoblot mit LAD-1 des BP180
Die beiden Positivkontrollen (PK) weisen nach Kontakt mit IgA-Zweitantikörpern jeweils Doppelbanden auf, wobei der unteren die entscheidende Bedeutung zukommt. Die Negativ-kontrollen (NHS = normales humanes Serum) und Patient 1 sind negativ, die Proben 2 und 3 positiv (schwarze Punkte).

4.4 Immunoblot mit rekombinantem BP180 NC16A (NC16A)

Die Beurteilung der Banden erfolgte visuell, wobei keiner der Patienten ein positives Ergebnis aufgewies.

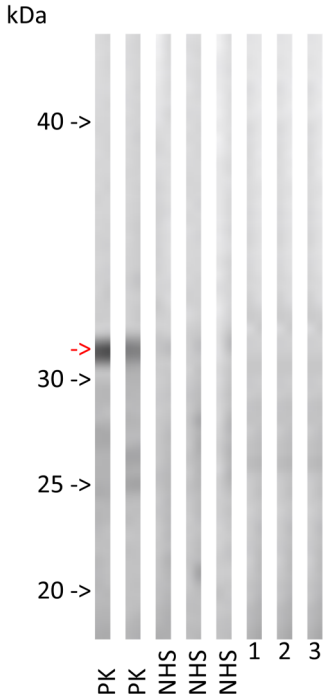

Abb. 4.5: Immunoblot mit BP180 NC16A
Die ersten beiden Streifen stellen die Positiv- (PK, roter Pfeil), die nächsten drei die Negativ-kontrollen (NHS = normales humanes Serum) dar. Als Zweitantikörper wurde IgA genutzt. Keine der Patientenseren weist eine Reaktivität auf.

.....

4.5 Immunoblot mit Extrakt kultivierter humaner Keratinozyten (KCE)

Da das verwendete Extrakt nicht für den Nachweis von Antikörpern gegen BP230 validiert war, erfolgte lediglich die Beurteilung der BP180-Reaktivität.
Alle Patientenproben waren auf BP180 negativ.

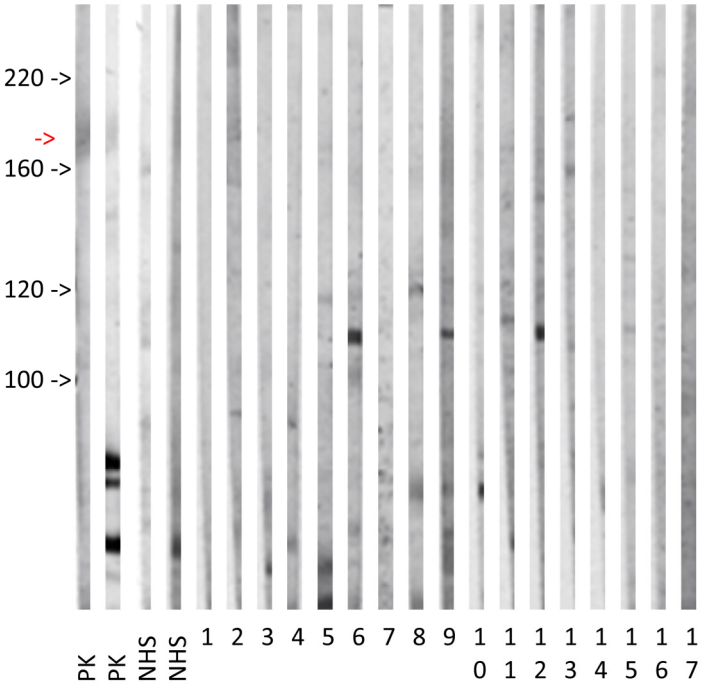

Abb. 4.6: Immunoblot mit Keratinozytenextrakt
Die ersten beiden Streifen stellen die Positivkontrollen (PK) dar, dort befindet sich jeweils eine Bande auf der Höhe von 180kDa (roter Pfeil), sowohl die Negativkontrolle (NHS = normales humanes Serum), als auch die Patientenseren weisen auf dieser Höhe keine Bande auf. Die Patienten 2, 9 und 17 haben wegen der Serumzusammensetzung eine Dunkelfärbung, weisen aber keine Banden auf. Die Bande der Probe 13 liegt nicht auf gleicher Höhe mit den PK und ist somit auch negativ.

4.6 Dermales Extrakt (DE)

Die Beurteilung der Banden erfolgte visuell, wobei keiner der Patienten ein positives Ergebnis aufwies.

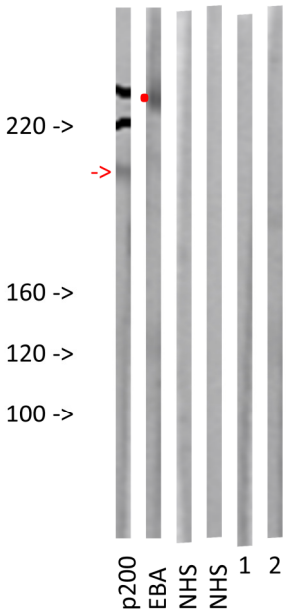

Abb. 4.7: Immunoblot mit dermalem Extrakt
Die Positivkontrollen stellen eine Bande auf dem ersten Streifen das Protein p-200 (p200 -> roter Pfeil), das bei Patienten mit Anti-p200-Pemphigoid nachgewiesen werden kann und auf dem zweiten Streifen das Protein, das bei Patienten mit Epidermolysis bullosa acquisita positive Typ VII Kollagen (EBA -> roter Punkt) dar. Sowohl die zwei folgenden Negativkontrollen (NHS = normales humanes Serum), als auch die Patienten zeigten keine Reaktivität mit dem p200 Protein oder Kollagen VII.

4.7 Immunoblot mit extrazellulärer Matrix (ECM) kultivierter humanisierter Keratinozyten

Zur Detektion der α3-, die β3- und γ2-Ketten von Laminin 332 diente ein IgG_4 Antikörper. Der Patient mit der Nummer 77 (1,3%) wies β3- und γ2-Ketten auf.

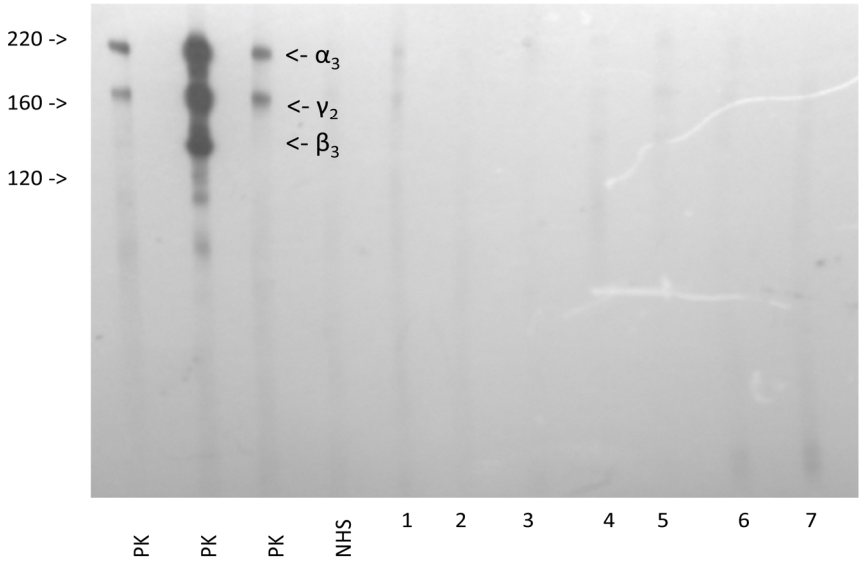

Abb. 4.8 Immunoblot mit extrazellulärer Matrix
Die ersten drei Streifen sind Positivkontrollen (PK) mit unterschiedlich starken Banden, diese wurden durch Variation der Zeit austariert. Der zweite Streifen stellt alle Banden (α_3, β_3, γ_2) dar. Sowohl die Negativkontrolle (NHS = normales humanes Serum), als auch die hier dargestellten Patientenseren sind negativ.

4.8 Deskriptive Statistik

Insgesamt konnten bei 18 Patienten (23%, 95% Konfidenzintervall 15 - 34) Autoantikörper gegen die dermo-epidermale Junktionszone nachgewiesen werden.

Tabelle 4.2: Ergebnistabelle nach Diagnose und Testverfahren

	atopisches Ekzem n (%)	**Psoriasis** n (%)	**Prurigo simplex subacuta** n (%)	**Rest** n (%)	**Gesamt** n (%)
IIF -> Sp					
IgG	1/ 21 (4,8)	0/ 14 (0)	1/ 13 (7,7)	0/ 31 (0)	2/ 78 (2,6)
IgA	0/ 21 (0)	0/ 14 (0)	0/ 13 (0)	0/ 31 (0)	0/ 78 (0)
ELISA					
BP 180 EU	2/ 21 (9,5)	0/ 14 (0)	2/ 13 (15,4)	1/ 31 (3,2)	5/ 78 (6,4)
BP 180 MBL	4 /21 (19,0)	0/ 14 (0)	1/ 13 (7,7)	1/ 31 (3,2)	6/ 78 (7,7)
BP 230 EU	1/ 21 (4,8)	0/ 14 (0)	0/13 (0)	0/ 31 (0)	1/ 78 (1,3)
BP 230 MBL	1/ 21 (4,8)	0/ 14 (0)	0/13 (0)	2/ 31 (6,5)	3/ 78 (3,8)
Immunoblot					
NC 16A	0/ 21 (0)	0/ 14 (0)	0/ 13 (0)	0/ 31 (0)	0/ 78 (0)
KCE IgG 180	0/ 21 (0)	0/ 14 (0)	0/ 13 (0)	0/ 31 (0)	0/ 78 (0)
LAD-1					
IgG	0/ 21 (0)	0/ 14 (0)	1/ 13 (7,7)	1/ 31 (3,2)	2/ 78 (2,6)
IgA	2/ 21 (9,5)	1/ 14 (7,1)	0/ 13 (0)	1/ 31 (3,2)	4/ 78 (5,1)
DE ->IgG_4					
p200	0/ 21 (0)	0/ 14 (0)	0/ 13 (0)	0/ 31 (0)	0/ 78 (0)
EBA	0/ 21 (0)	0/ 14 (0)	0/ 13 (0)	0/ 31 (0)	0/ 78 (0)
ECM IgG_4	0/ 21 (0)	0/ 14 (0)	1/ 13 (7,7)	0/ 31 (0)	1/ 78 (1,3)
Summe	11/ 21 (52,4)	1/ 14 (7,1)	6/13 (46,2)	6/ 31 (19,4)	24/ 78 (30,8)

IIF: indirekte Immunfluoreszenz, Sp: Humane Spalthaut, EU: Euroimmun, MBL: Medical & Biological Laboratories, KCE: Keratinozytenextrakt, LAD-1: Lineare-IgA-Dermatose Antigen 1, DE: dermales Extrakt, p200: p200-Antigen, EBA: Epidermolysis bullosa acquisita, ECM: extrazelluläre Matrix
Links ist das jeweilige Testverfahren aufgeführt, oben die verschiedenen Diagnosen. „n“ bezeichnet die Anzahl der positiv getesteten Patientenseren in Bezug auf die Gesamtzahl für die jeweilige Diagnose, wobei ein Patient sowohl unter einem atopischen Ekzem, als auch unter einer Psoriasis litt, daher resultiert die Gesamtanzahl 78.

Folgende Tabelle präsentiert ebenfalls die Ergebnisse dieser Arbeit in anderer Darstellung:

Tabelle 4.3: Ergebnistabelle nach Diagnose und Testverfahren

		IIF -> Sp		ELISA					KCE	LAD-1		DE ->IgG$_4$		ECM	
Diag	Pat	IgG	IgA	BP 180 EU	BP 180 MBL	BP 230 EU	BP 230 MBL	NC 16A	IgG 180	IgG	IgA	P200	EBA	IgG$_4$	^
I	12	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	
	54	–	–	30,3	9	–	–	–	–	–	*	–	–	–	0
	57	–	–	–	20,0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0
	59	–	–	–	12	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0
	63	BD pos	–	67,0	27,8	119,0	51	–	–	–	–	–	–	–	0
	76	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	
II	45	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	
III	11	BD pos	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	DIF neg
	24	–	–	30,2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	DIF neg
	66	–	–	148,7	10	–	–	–	–	–	–	–	–	–	DIF neg
	71	–	–	–	–	–	–	#	–	+	–	–	–	–	
	77	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	
IV	28	–	–	40,3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	DIF neg
	30	–	–	–	–	–	10,6	–	–	–	–	–	–	–	DIF neg
	38	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	
	50	–	–	–	48,2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	DIF neg
	60	–	–	–	–	–	17	#	–	–	–	–	–	–	0
	74	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	

IIF: indirekte Immunfluoreszenz, Sp: Humane Spalthaut, EU: Euroimmun, MBL: Medical & Biological Laboratories, KCE: Keratinozytenextrakt, LAD-1: Lineare-IgA-Dermatose Antigen 1, DE: dermales Extrakt, p200: p200-Antigen, EBA: Typ VII Kollagen-> positiv bei Patienten mit Epidermolysis bullosa acquisita, ECM: extrazelluläre Matrix, ^: Zusatzinformation, Diag: Diagnose, Pat: Patientennummer, I: Patienten mit atopischem Ekzem, II: Patienten mit Psoriasis, III: Patienten mit Prurigo simplex subacuta, IV: Patienten mit einer anderen Dermatose, – : negatives Ergebnis, +: positives Ergebnis, *: kein Probenmaterial, 0: DIF konnte wegen fehlender Kooperativität nicht bestimmt werden, DIF: Kontrolle mittels direkter Immunfluoreszenz, neg: negatives Ergebnis, #: nicht auswertbar, da die Anti-GST-Reaktivität nicht vollständig blockiert werden konnte

Links sind die verschiedenen Diagnosen und oben das jeweilige Testverfahren angegeben. In grau unterlegt stehen die Patientennummern, der jeweils positiven Ergebnisse.

4.9 Analysen

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen positiven Ergebnissen und der Juckreizdauer über 1.000 Wochen konnte dargestellt werden (Tab. 4.4 → 1). Dies bestätigte sich unter Anwendung einer automatischen Modellverbesserung (Tab. 4.4 → 2).

In konventionellen Testsystemen (Immunoblot und indirekte Immunfluoreszenz) ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen Autoantikörpern und den dargestellten Komponenten (Tab 4.4 → 3), während beim ELISA eine Signifikanz bezüglich der Juckreizdauer und Autoantikörper erkennbar war (Tab. 4.4 → 4), die sich nach automatischer Optimierung bestätigte.

Tabelle 4.4: Darstellung der signifikanten Zusammenhänge der Ergebnisse mithilfe von p-Werten

	Komponenten	p-Wert			Komponenten	p-Wert
Pos & Juckreiz >1.000	Patient positiv → Juckreiz >1.000	0.0179		**ELISA & Juckreiz >1.000**	Patient positiv → Juckreiz >1.000	0.0011
Pos & Juckreiz >1.000 nach aMV	Patient positiv → Juckreiz >1.000	0.030				
konventionelle Systeme	Patient positiv → Alter >Median	0.4390				
	Patient positiv → Geschlecht	0.6280				
	Patient positiv → Juckreiz >1.000	0.7173				
	Patient positiv → Diagnose	0.4459				

Pos & Juckreiz > 1.000: positive Testergebnisse mit signifikantem Zusammenhang zum Juckreiz über 1.000 Wochen, aMV: automatischer Modellverbesserung, konventionelle Systeme: Immunoblot und indirekte Immunfluoreszenz, ELISA & Juckreiz >1.000: positive Testergebnisse im ELISA mit signifikantem Zusammenhang zum Juckreiz über 1.000 Wochen
Seitlich sind die jeweils geprüften Kombinationen aufgeführt. Die Komponenten geben die in Beziehung stehenden Parameter (Alter, >Median, Geschlecht, Diagnose, Juckreiz >1.000 Wochen jeweils oder kombiniert) in Bezug auf positive Ergebnisse an, wobei Geschlecht und Diagnose nicht weiter definiert sind. P-Werte unter 0,05 sind in rot gekennzeichnet signifikant.

5 Diskussion

In den letzten zehn Jahren ist die Inzidenz des bullösen Pemphigoid in Deutschland erheblich gestiegen. (1995 → 6,6/ 1 Million Einwohner/ Jahr; 2001/2002 → 13/ 1 Million Einwohner/ Jahr). Ähnliche Zahlen konnten für Frankreich und Großbritannien ermittelt werden [Langan et al. 2008; Joly et al. 2012]. Die Inzidenz des bullösen Pemphigoid wurde für die Schweiz mit 12, für Schottland mit 14 und in Frankreich auf 23/ 1 Million Einwohner/ Jahr bestimmt. Im Vereinigten Königreich Großbritannien mit Nordirland lag sie hingegen deutlich höher bei 66 Neuerkrankungen/ 1 Million Einwohner/ Jahr [Gudi et al. 2005; Langan et al. 2008; Bertam et al. 2009; Marazza et al. 2009; Joly et al. 2012]. Ursächlich hierfür sind zum einen bessere Diagnoseverfahren, zum anderen, da es Erkrankungen des höheren Lebensalters sind, die Veränderung der Bevölkerungsstruktur [Bertram et al. 2009]. Zusätzlich konnte in anderen Studien erwiesen werden, dass die Induktion der Erkrankung durch eine Medikation mit Aldosteron, Spironolakton oder bestimmten Neuroleptika ausgelöst werden kann [Bastuji-Garin et al. 1996; Bastuji-Garin et al. 2011]. Die Differenzierung der für die Erkrankungen ursächlichen Autoantikörper und ihrer Zielantigene führte zu exakteren Diagnosen und ermöglichte spezifische Therapie-ansätze [Schmidt & Zillikens, 2009b]. Dabei nehmen BP180 und BP230 eine Schlüsselstellung bei der Verankerung basaler Keratinozyten in der Basalmembran ein.
Neben der zunehmenden Inzidenz ist auch die Mortalität der Patienten mit bullösem Pemphigoid auffällig. In zwei großen Studien zeigte sich eine hohe 1-Jahres-Mortalität nach Diagnosestellung des bullösen Pemphigoid, wobei bestimmte Risikofaktoren (Lebensalter, Prednisolondosis >37mg/d, Albuminspiegel <3,6g/dl, Blutsenkungs-geschwindigkeit >300mm/h, Karnofsky Index ≥40) eine entscheidende Rolle spielten [Roujeau et al. 1998; Joly et al. 2005].

Bereits bekannt ist, dass ein höheres Lebensalter der Patienten, typischerweise über 75 Jahre, ein Risikofaktor für das Auftreten des bullösen Pemphigoid ist [Schmidt et al. 2011]. In der Tat steigt die Inzidenz mit zunehmendem Alter und liegt bei den über 80-Jährigen zwischen 150 und 330/ 1 Million Einwohner/ Jahr [Schmidt & Zillikens, 2013].

In der vorliegenden kontrollierten prospektiven Studie überprüfte ich die Hypothese, ob chronischer Juckreiz ein Risikofaktor für das Auftreten von Autoantikörpern gegen die dermo-epidermale Junktionszone darstellt. Im Gegensatz zu den anderen bullösen Autoimmundermatosen leiden alle Patienten mit bullösem Pemphigoid an ausgeprägtem Juckreiz [Kippes et al. 1999].

Ursächlich könnten permanente Hautreizungen sein, die zur Beschädigung und anschließender Exponierung sonst verborgener Epitope auf Proteinen der dermo-epidermalen Junktionszone gegenüber dem Immunsystem führen und Autoantikörper z.B. gegen BP180 und BP230 bilden [Di Zenzo et al. 2011].

Bei Verifizierung wäre ein Screening auf diese Antikörper bei unklaren dauerhaft juckenden Dermatosen sinnvoll, um möglichst früh eine Diagnose und Therapieeinleitung zu ermöglichen.

Darüber hinaus wären aufgrund dieser Erkenntnis, dass der Ausbildung von Autoantikörpern eine mechanische Reizung zugrunde liegt, weitere Studien anzuschließen.

In der vorliegenden Studie wurden 78 Seren von Patienten mit mindestens 6 Wochen bestehender Juckreizdauer untersucht.

Weil die Inzidenz der Erkrankung ab dem 60. Lebensjahr deutlich ansteigt [Jung et al. 1999], Juckreiz außerdem eine der häufigsten Beschwerden im Alter darstellt [Thaipisuttikul, 1998] und mit zunehmendem Lebensalter steigt [Ständer et al. 2010], traf die Auswahl der Patienten hauptsächlich ältere Personen mit einem Altersmedian von 67 Jahren.

Die Geschlechterverteilung mit 45% weiblichen und 55% männlichen Probanden entsprach etwa der Bevölkerungspopulation und ebenfalls dem Verteilungsmuster des bullösen Pemphigoid.

Autoantikörper, die für subepidermal Blasen bildende Autoimmundermatosen typisch sind, wurden in der vorliegenden Studie mittels *Immunoblot*, *ELISA* und *indirekter Immunfluoreszenz (auf humaner Spalthaut)* untersucht.

Um die Hypothese zu bestätigen, müsste ein signifikanter Anteil der Patienten mit chronischem Juckreiz Autoantikörper gegen die dermo-epidermale Junktionszone aufweisen. Sensitivste Methode ist hierbei der Autoantikörper-Nachweis im BP180-NC16A- und BP230-ELISA [Zillikens et al. 1997a; Kippes et al. 1999; Schmidt et al. 2000b; Sakuma-Oyama et al. 2004; Thoma-Uszynski et al. 2004; Kromminga et al. 2004; Yoshida et al. 2006; Feng et al. 2008]. Bei länger bestehendem Juckreiz wäre außerdem zu erwarten, dass eher Autoantikörper nachgewiesen werden könnten.

Einige Autoren haben an kleinen Patientenpopulationen bereits über einen Zusammenhang von Erkrankungen mit Juckreiz und dem Auftreten von Autoantikörpern gegen Proteine der dermo-epidermalen Junktionszone berichtet [Rieckhoff-Cantoni et al. 1992; Hofmann et al. 2003; Jedlickova et al. 2008; Feliciani et al. 2009; Hofmann et al. 2009].

In der vorliegenden Arbeit fand bei allen Testverfahren eine Untersuchung nach verschiedenen Diagnosen (atopisches Ekzem, Psoriasis, Prurigo simplex subacuta, andere Dermatosen), des Lebensalters, des Geschlechts und der Juckreizdauer als gegebenenfalls relevante Einflussfaktoren statt.

Als Schnitt wurde beim Lebensalter der Median (67 Jahre) und bei der Juckreizdauer 1.000 Wochen gewählt. 1.000 Wochen entsprechen ungefähr 20 Jahren, dies stellt nicht nur eine sehr lange Zeit zur Bildung von Autoantikörpern dar, sondern erwies sich auch statistisch aufgrund der Verteilungskurve der positiv getesteten Personen in Abhängigkeit auf die Juckreizdauer (Abb. 4.1) als sinnvoll.

Eine Reaktion in der *indirekten Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut* findet sich bei verschiedenen Autoimmundermatosen. Das bullöse Pemphigoid zeigt dabei eine Sensitivität von 80-90% [Kelly & Wojnarowska, 1988; Machado et al. 1992; Ghohestani et al. 1996; Ghohestani et al. 1997; Korman, 1998; Kippes et al. 1999; Chan et al. 2003], der Lichen planus pemphigoides [Mora et al. 1983; Davis et al. 1991] und die Epidermolysis bullosa acquisita [Ghohestani et al. 1997] sogar von 100%, bei allerdings sehr kleinen

Kohorten (3-4 Patienten/ 10 Patienten). Die Sensitivität der Lineare-IgA-Dermatose liegt bei 73% [Willsteed et al. 1990; Georgi et al. 2001], die des Schleimhautpemphigoid bei 50-70% [Kelly & Wojnarowska, 1988; Bernard et al. 1990; Ghohestani et al. 1997; Schmidt et al. 2001] und des Pemphigoid gestationis nur bei 20% [Anhalt & Morrison, 1991]. Außer der Epidermolysis bullosa acquisita, die durch eine dermale Bindung gekennzeichnet ist, weisen alle anderen Krankheitsbilder eine epidermale Bindung auf.

In der vorliegenden Studie ließen sich bei zwei Patienten (2,6%) IgG Autoantikörper gegen die epidermale Seite des Spaltes in der indirekten Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut nachweisen.

Bei der ersten Patientin, ohne weiteres positives Ergebnis in einem der anderen Testsysteme, wurde eine direkte Immunfluoreszenz angeschlossen mit negativem Befund. Bei der anderen Patientin mit zusätzlich positiven Ergebnissen in den ELISA konnte leider keine direkte Immunfluoreszenz erfolgen.

Signifikante Relationen zu den vorab gestellten Kofaktoren (Juckreizdauer, Diagnosen, Alter, Geschlecht) ergaben sich nicht. Als positive Ausreißer fanden diese Ergebnisse daher keine Berücksichtigung.

Die Ergebnisse in den *ELISA-Verfahren* zeigten, dass drei Patienten Anti-BP230- und acht Patienten Anti-BP180-NC16A-Autoantikörper aufwiesen. Zuerst wurden alle ELISA als eigene Testverfahren beurteilt und die Ergebnisse im Nachhinein mit den gleichen ELISA des jeweils anderen Herstellers verglichen.

Bei der differenzierten Betrachtung der verschiedenen Hersteller (MBL/ Euroimmun) trat eine Übereinstimmung beim BP230- (Nr. 63) und drei Übereinstimmungen beim BP180-NC16A-ELISA (Nr. 54, 63, 66) auf, wobei eine Patientin (Nr. 63) in allen vier ELISA positive Ergebnisse zeigte (Abb. 4.3). Keine der Übereinstimmungen waren jedoch wegweisend, da es weder signifikante Zusammenhänge noch Unterschiede zu den definierten Kofaktoren (Juckreizdauer, Diagnosen, Alter, Geschlecht) gab.

Keines der Testsysteme des einen Herstellers zeigte eine signifikant unterschiedliche Anzahl an positiven Reaktionen im direkten Vergleich zu dem des anderen Herstellers. Hieraus ergibt sich, dass die Unterschiede zwischen den Produkten beider Firmen nur gering sind.

Insgesamt wiesen neben der Patientin (Nr. 63) mit vier positiven Ergebnissen auch zwei Patienten jeweils in beiden BP180-NC16A-ELISA Reaktionen auf (Nr. 54, 66). Weitere zwei Personen hatten allein im Euroimmun-BP180-NC16A- (Nr. 25, 28) und drei lediglich im MBL-BP180-NC16A-ELISA (Nr. 50, 57, 59) positive Ergebnisse.
Zwei weitere Patienten zeigten nur Reaktionen beim MBL-BP230-ELISA (Nr. 30, 60). Somit wiesen insgesamt sieben Patienten bei einem ELISA und drei Patienten in zwei oder mehr ELISA Autoantikörper-Reaktivität auf.

Die Patientin (Nr. 63) mit in allen ELISA-Verfahren positiven Befunden war 82 Jahre alt, litt an einem atopischen Ekzem und darüber hinaus seit 12 Wochen unter Juckreiz. Zusätzlich waren die indirekte Immunfluoreszenz positiv, alle anderen Testsysteme dagegen negativ. Eine direkte Immunfluoreszenz lag leider nicht vor. Bei dieser Patientin kann ein bullöses Pemphigoid ohne klinische Anzeichen der Erkrankung nicht sicher ausgeschlossen werden. Zudem wurde in verschiedenen Arbeiten dargestellt, dass eine kleine Anzahl von Patienten, die Exkoriationen -die mit hoher Wahrscheinlichkeit bei der Patientin bestanden- und Autoantikörper aufwiesen, später eine Blasen bildende Autoimmundermatose entwickelten [Amato et al. 1988; Tamada et al. 1995; Wever et al. 1995, Laffitte, 2001; Powell et al. 2002; Schmidt et al. 2002b; Tashiro et al. 2005]. Es wurde berichtet, dass Kratzen zu einer klinischen Variante der Prurigoform des bullösen Pemphigoid führen kann, wobei die Unterscheidung zum bullösen Pemphigoid nur durch eine direkte Immunfluoreszenz möglich ist [Gengoux & Lachapelle, 1997]. Zudem wurden verschiedene klinische Formen des bullösen Pemphigoid beschrieben unter dem Bild einer Urtikaria, eines Ekzems, einer Erythrodermie, einer Intertrigo, einer Prurigo simplex subacuta oder Prurigo nodularis [Schmidt et al. 2011]. Bei diesen klinischen Varianten kann es zu starkem Juckreiz kommen, während das klassische Bild mit prallen Blasen und Erosionen fehlt.

Abgesehen vom Geschlecht und der Tatsache, dass keines der weiteren Testsysteme ein positives Ergebnis erbrachte, zeigten die zwei Patientinnen mit positivem Befund in beiden BP180-NC16A-ELISA keine Gemeinsamkeiten. Eine 67 jährige Patientin (Nr. 54) litt 3484 Wochen unter Juckreiz bei atopischem Ekzem. Die andere 37 jährige

Probandin (Nr. 66) wies lediglich 12 Wochen Juckreiz bei einer Prurigo simplex subacuta auf.

Bei allen anderen Patienten zeigte sich lediglich in den dargestellten ELISA Systemen Autoantikörperreaktivität, alle weiteren Testsysteme blieben negativ.
Von den sieben Patienten, die nur in einem der vier ELISA Systeme Antikörper aufwiesen, lagen drei unter und vier über dem Altersmedian. Vier der Patienten litten seit über 1.000 Wochen an Juckreiz, drei der sieben Patienten waren Männer. Zwei der Patienten hatte ein atopisches Ekzem, vier litten an anderen Dermatosen und ein Patient an einer Prurigo simplex subacuta. Eine signifikante Relation von Autoantikörpern zu den Faktoren (Alter, Juckreizdauer, Geschlecht, Diagnose) ergab sich nicht.
Auffällig war zudem, dass die ELISA-Werte relativ niedrig lagen und nur bei fünf der zehn Patienten Reaktivitäten oberhalb des Doppelten der unteren Nachweisgrenze gemessen wurden. Dabei handelte es sich immer um einen der BP180-NC16A-ELISA und in einem Fall (Nr. 63) um alle vier ELISA. Da gezeigt werden konnte, dass die Spiegel der Serumautoantikörper gegen BP180-NC16A mit der Krankheitsaktivität der Patienten mit bullösem Pemphigoid korrelieren [Schmidt et al. 2000a], weist dies -wie schon die Tatsache, dass es keine signifikanten Übereinstimmungen zwischen den jeweiligen ELISA (BP180/ BP230) der beiden Hersteller (MBL/ Euroimmun) gab- darauf hin, dass zirkulierende Autoantikörper gegen BP180 und BP230 im ELISA bei den Studienpatienten mit chronischen Juckreiz nicht sicher nachzuweisen waren.
In einer Studie konnten BP180 und BP230 über 5 Jahre ohne Auftreten eines bullösen Pemphigoid oder einer anderen Dermatose nachgewiesen werden [Wolz et al. 2013].

In die gleiche Richtung zielte die Analyse der Ergebnisse mittels logistischer Regression. Hier zeigte zwar der Likelihood-Ratio-Test einen signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhtem Lebensalter (>67 Jahre) und einer der gestellten Diagnosen (atopisches Ekzem, Psoriasis, Prurigo simplex subacuta, andere Dermatosen) zu positiven Resultaten im *Euroimmun-BP180-NC16A-ELISA*. Die positiven Resultate konnten durch die übrigen parallel durchgeführten Testverfahren nicht bestätigt werden, sie unterstützen daher die obige Schlussfolgerung.

Der *MBL-BP180-NC16A-ELISA* weist eine Sensitivität von 89,0% und eine Spezifität von 94,8% auf [Sitaru et al. 2007]. In der vorliegenden Studie zeigte er einen signifikanten Zusammenhang zur Juckreizdauer über 1.000 Wochen, somit sind die meisten Patienten, die Autoantikörper bei Juckreiz bilden, erfasst.
Eine geringe Validität resultierte allerdings aus der relativ kleinen Kohorte. Insgesamt sind in diesem Testverfahren nur sechs der 78 Probanden positiv getestet worden, vier von ihnen hatten eine Juckreizdauer von über 1.000 Wochen, somit ist das Ergebnis signifikant positiv. Dennoch muss ein solcher Zusammenhang nicht zwingend kausaler Natur sein. Auch Unterschiede, die statistisch signifikant sind, können zufällig sein. Je größer die Anzahl der getesteten Personen, desto wahrscheinlicher ist der gestellte Zusammenhang [Dubben & Beck-Bornholdt, 2006]. Sechs Proben sind daher im Sinne der Validität als eher gering anzusehen, was Zweifel bezüglich der Reliabilität aufwirft. Zusätzlich ließ der BP180-NC16A-ELISA von der Fima Euroimmun keinen signifikanten Zusammenhang zur Juckreizdauer erkennen, was der Fall hätte sein müssen, wenn das Ergebnis der Tatsache entspräche.

Es bleibt die signifikante Korrelation zwischen erhöhtem Lebensalter und Autoantikörpernachweis beim *Euroimmun-BP180-NC16A-ELISA* bestehen, da signifikant häufiger Patienten über dem Altersmedian (67 Jahre) Autoantikörper aufwiesen.
Im Hinblick auf die hohe Sensitivität (89%) und vor allem Spezifität (98%) des BP180-NC16A-ELISA [Zillikens et al. 1997a; Kippes et al. 1999; Schmidt et al. 2000b; Sakuma-Oyama et al. 2004; Thoma-Uszynski et al. 2004; Kromminga et al. 2004; Yoshida et al. 2006; Feng et al. 2008] entkräftet das negative Ergebnis bezüglich der Juckreizdauer zusätzlich die Vermutung, dass Autoantikörper bei länger bestehendem Juckreiz ausgebildet werden können.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Lebensalter und der Autoantikörperbildung stellte sich ebenfalls beim *MBL-BP230-ELISA* dar, die Sensitivität liegt lediglich bei 57,8%, die Spezifität bei 97,5% [Damoiseaux et al. 2012]. In der vorliegenden Studie waren drei der insgesamt 78 Patienten positiv getestet worden, alle mit einem Alter über 80 Jahren. Dies und das Euroimmun-BP180-NC16A-ELISA Ergebnis unterstützen

somit die Aussage, dass ältere Patienten signifikant häufiger Autoantikörper gegen die dermo-epidermale Junktionszone richten [Hachisuka et al. 1996, Schmidt & Zillikens, 2011].

Interessant ist die These von Widmer [et al. 2006], der den Alterungsprozess als mögliche Ursache für die Expression immunogener Epitope in der dermo-epidermalen Junktionszone postuliert.

Allerdings sind in den genannten Arbeiten [Hachisuka et al. 1996; Schmidt & Zillikens, 2011] zum einen Testverfahren angewandt worden, die in der vorliegenden Studie nicht getestet wurden (indirekte Immunfluoreszenz auf Ösophagus, Immunoblot mit epidermalem Extrakt); zum anderen zeigte das vergleichbare Testverfahren (indirekte Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut) bei lediglich einem der drei Patienten eine Reaktivität.
In anderen Studien war ersichtlich, dass Autoantikörper gegen die dermo-epidermale Junktionszone auch bei gesunder Population auftreten [Kobayashi et al. 2002; Thoma-Uszynski et al. 2004; Foureur et al. 2006; Yoshida et al. 2006; Wieland et al. 2010; Blöcker et al. 2012], wobei meist eine Assoziation zu mittlerem und höherem Alter besteht [Desai et al. 2008]. Die Durchführung geschah mittels epidermalen Blot- der in der vorliegenden Studie nicht zum Einsatz kam- indirekter Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut, Anti-BP180-NC16A- und Anti-BP230-ELISA.

Im *EU-BP230-ELISA* ergab das bereits vorgestellte Ergebnis der 82 jährigen Patientin mit atopischem Ekzem einen positiven Befund; es konnte wegen fehlender Relation zu den Kofaktoren (Juckreizdauer, Diagnosen, Alter, Geschlecht) vernachlässigt werden.

Der Goldstandard in der Diagnostik des bullösen Pemphigoid, die direkte Immunfluoreszenz, wurde bei den 11 Patienten mit positivem Ergebnis in den hier durchgeführten ELISA oder der indirekten Immunfluoreszenz teilweise post hoc durchgeführt, um ein bullöses Pemphigoid sicher auszuschließen. Ein 79 jähriger Patient mit Prurigo simplex subacuta, achtwöchigem Juckreiz und positivem Befund in der indirekten Immunfluoreszenz, wies in der direkten Immunfluoreszenz einen

Negativbefund auf. Bei der anderen Patientin konnte keine direkte Immunfluoreszenz durchgeführt werden.

Von den zehn im ELISA positiv getesteten Patienten, haben fünf –vier davon mit atopischem Ekzem- der Probebiopsie nicht zugestimmt.
Drei dieser Patienten liegen über dem Altersmedian, was für die Diagnose des bullösen Pemphigoid sprechen würde. Neben dem Ausschlusskriterium: keine Blasenbildung bei Probeentnahme, ist über die Personen leider nichts bekannt, somit müssen weitere Vermutungen (z.B. zu möglicherweise auslösenden Medikamenten) unterbleiben.
Insgesamt sollte aufgrund der nicht erfolgten direkten Immunfluoreszenz von einer leichten Verfälschung der Studie ausgegangen werden und bei weiteren Arbeiten gegebenenfalls auf die Entnahme direkt zu Beginn der Studie geachtet werden.

Im *Immunoblot mit Überstand von kultivierten humanen Keratinozyten* wurden IgG- und IgA- Antikörper gegen LAD-1, die lösliche Ektodomäne von BP180, untersucht. LAD-1 ist das Zielantigen der linearen IgA Dermatose, die durch IgA-Anti-LAD-1 Antikörper charakterisiert ist [Marinokovich et al. 1996; Roh et al. 2000; Kromminga et al. 2000; Georgi et al. 2001]. IgA Anti-LAD-1 Reaktivität lässt sich nicht nur bei Patienten mit linearen IgA-Dermatosen, sondern auch bei Untergruppen von Patienten mit Schleimhautpemphigoid [Schmidt et al. 2001] und Patienten mit bullösem Pemphigoid nachweisen [Pas et al. 1997; Kromminga et al. 2000; Schmidt et al. 2002a]. IgG Reaktivität gegen LAD-1 findet sich bei Schleimhautpemphigoid und bullösem Pemphigoid in 75% und 76% der Fälle [Kromminga et al. 2000; Oyama et al. 2006]. Das bullöse Pemphigoid und die lineare IgA-Dermatose gehören somit wahrscheinlich einem Spektrum derselben Erkrankung an, was durch den Nachweis von IgA-Antikörpern in diesem Blot bei der Mehrheit des Patientenklientels unterstützt wird [Kromminga et al. 2000; Schmidt et al. 2009a]. Etwa 80% der bullösen Pemphigoid-Patienten weisen IgA-Reaktivität auf, sie ist jedoch jeweils schwächer als die IgG-Reaktivität [Döpp et al. 2000; Kromminga et al. 2000].
In der vorliegenden Studie zeigten vier Seren (5,1%) eine IgA- und zwei weitere Seren (2,6%) eine IgG-Reaktivität. Zusätzlich waren keine signifikanten Zusammenhänge von

positiven Ergebnissen und den Kofaktoren (Juckreizdauer, Diagnosen, Alter, Geschlecht) zu ermitteln. Keine der LAD-1 reaktiven Seren ergab ein positives Ergebnis in einem der anderen Testsysteme.

Eine Autoantikörperbildung gegen eine rekombinante Form der NC16A Domäne von BP180 kann mit Hilfe des *Immunoblot mit rekombinantem BP180-NC16A* bei fünf verschiedenen subepidermalen Autoimmundermatosen nachgewiesen werden: bullöses Pemphigoid, Pemphigus gestationis, Lichen planus pemphigoides und Schleimhautpemphigoid [Schmidt & Zillikens, 2011], wobei circa 90% der bullösen Pemphigoid-Patienten positiv reagieren [Murakami et al. 1996; Zillikens et al. 1997a+b; Sitaru et al. 2007]. Die in der vorliegenden Studie angewandte IgA-Reaktivität wird mit 23,5% angegeben [Nakatani et al. 1998].
Eine Untersuchung der Patienten in dieser Studie ergab bei diesem Immunoblot jedoch in keiner Probe ein positives Ergebnis.
Vorab bestand die Notwendigkeit der Eliminierung von Störfaktoren, da unspezifische Hintergrundreaktivitäten durch Antikörper -die auch in Seren Gesunder vorhanden sind- das Ergebnis der Detektion verfälschten. Dabei wurde stufenweise die Dosis der Glutathion-S-Transferasen erhöht, welche die unspezifischen Antikörper gegen das Trägerprotein absorbierte, so dass nur noch die gegen BP180-NC16A agierenden Antikörper erfasst werden konnten.

Das bullöse Pemphigoid und die lineare IgA-Dermatose gehören wahrscheinlich einem Spektrum derselben Erkrankung an, was durch den Nachweis von IgA-Antikörpern im *Immunoblot mit Extrakt von kultivierten humanen Keratozyten auf BP180* bei der Mehrheit dieses Patientenklientels unterstützt wird [Kromminga et al. 2000; Schmidt et al. 2009a]. Etwa 80% der bullösen Pemphigoid-Patienten weisen IgA-Reaktivität auf, sie ist jedoch jeweils schwächer als die IgG-Reaktivität [Döpp et al. 2000; Kromminga et al. 2000].
In der vorliegenden Studie konnten bei dem Immunoblot keine positiven Ergebnisse detektiert werden.

Beim *dermalen Extrakt* werden Autoantikörper gegen das p200-Protein (Sicherung der Diagnose des Anti-p200-Pemphigoid) und Autoantikörper gegen Kollagen Typ VII (Zielantigen der Epidermolysis bullosa acquisita oder bullösem Lupus erythematodes) nachgewiesen [van Beek et al. 2012].
Im Immunoblot mit dermalem Extrakt wurden in der vorgestellten Studie jedoch keine Antikörper gegen das p200 Protein oder Typ VII Kollagen detektiert.

Laminin 332 wurde als Zielantigen bei etwa 25-30% der Patienten mit Schleimhautpemphigoid beschrieben [Domloge-Hultsch et al. 1992; Moll & Moll, 1998; Chan et al. 2003].
In der vorliegenden Studie zeigte sich im Immunoblot mit extrazellulärer Matrix von kultivierten humanen Keratinozyten bei einem Patienten (1,3%) mit Prurigo simplex subacuta eine Anti-Laminin 332 Reaktivität, die in keinem Zusammenhang mit Reaktivitäten in anderen Testsystemen stand.

Bei Wertung aller Seren mit positivem Ergebnis in einem der Testsysteme war ein signifikanter Zusammenhang zwischen Autoantikörpern und einer Juckreizdauer über 1.000 Wochen auffällig. Die Unterteilung der Testsysteme in konventionelle (Immunoblot und indirekte Immunfluoreszenz) und ELISA-Systeme zeigte nur noch in den ELISA-Systemen einen signifikanten Zusammenhang mit der Juckreizdauer.
Allerdings sind die Ergebnisse unter Vorbehalt zu sehen, da ELISA-Systeme trotz oder vermutlich gerade wegen ihrer Vorteile in der Standardisierbarkeit und praktischen Handhabung eine Neigung aufweisen, bei bestimmten Patienten gehäuft falsch-positive Resultate zu liefern. Eine Juckreizdauer von über 1.000 Wochen scheint mit einer erhöhten Anzahl falsch positiver Testergebnisse zu korrelieren.

Im Übrigen muss auch auf die Qualitäten der Textsysteme hingewiesen werden. Die indirekte Immunfluoreszenz und die Immunoblot sind wegen der visuellen Beurteilung beobachterabhängig mit daraus folgendem negativen Einfluss auf die Reliabilität und Validität.

Aber auch im ELISA stellt die Reaktivität nicht nur die erwünschten Autoantikörper, sondern auch falsch-positive Proben dar.

Generell muss das Auftreten positiver Reaktionen durch irreguläre Autoantikörper, die keinen Krankheitswert haben, und das Auftreten von fehlerhaften Signalen in den Testsystemen ebenfalls berücksichtigt werden.

Ferner ist darauf hinzuweisen, dass bedingt durch die kleine Kohorte der vorliegenden Studie, eine eingeschränkte Validität besteht.

In einer weiteren prospektiven Studie (Inauguraldissertation von Amelie Dohse -in Vorbereitung), wurden zwei weitere Kollektive mit den gleichen Testsystemen in denselben Laboratorien untersucht [Van Beek et al. 2014].

Ein Blutspender-Kollektiv beinhaltete 50 Seren von gesunden Blutspendern im Alter von 22 bis 59 Jahre, das zweiten Kollektiv umfasste 93 Seren von über 70 Jährigen mit nichtentzündlichen Hauterkrankungen.

Ein Vergleich der vorliegenden Daten mit diesen beiden Kollektiven zeigte keine signifikanten Unterschiede im Fisher´s exact Test.
Die dargestellten mit dem Alter assoziierten Verfahren weisen nahezu gleiche Ergebnisse auf (Euroimmun-BP180-NC16A-ELISA -> 6% /6%; MBL-BP230 -> 3%/4%). Wenn aber das Lebensalter ein bedeutender Faktor für die Autoantikörperbildung wäre, hätte sich dies in einem signifikanten Ergebnis der älteren Probandengruppe darstellen müssen. Es könnte daher an dieser Stelle ein fehlender Bezug zu höherem Lebensalter vorsichtig interpretiert werden, wie bereits in einer anderen Studie angeführt [Wieland et al. 2010].
Der mit dem Juckreiz assoziierte MBL-BP180-NC16A-ELISA zeigt einen etwas höheren Prozentsatz (4%, 8%), wobei kein Unterschied im Fisher´s exact Test festgestellt werden konnte.

In der Gesamtschau aller Ergebnisse ließ sich ein Zusammenhang zwischen chronischem Juckreiz und Serum-Autoantikörpern gegen Proteine der dermo-epidermalen Junktionszone nicht nachweisen. Somit scheint chronischer Juckreiz kein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer bullösen Autoimmundermatose, insbesondere eines bullösen Pemphigoid zu sein.

Ein Screening auf Autoantikörper bei diesem Patientenklientel ist daher keine klinische Option.

Unterstützt wird dieses Fazit durch die prospektive Studie von *Jedlickova et al. [2008]*, in der 90 alte Patienten (78,6 ± 4,7 Jahre), die, in vier Gruppen unterteilt, untersucht wurden: Patienten mit Diabetes mellitus, Patienten mit juckenden Hauterkrankungen, Patienten mit Diabetes mellitus und juckenden Hauterkrankungen, sowie Patienten ohne Diabetes mellitus und ohne juckende Hauterkrankungen.
Der Nachweis von Autoantikörpern mittels indirekter Immunfluoreszenz auf Affenösophagus gelang bei 11 (12,2%) der Patienten. Zusätzlich konnten einige Ergebnisse nicht eindeutig positiv oder negativ zugeordnet werden. Diese und die positiven 11 Ergebnisse unterzog das Team einer Prüfung mit ELISA gegen BP180, BP230 und Laminin 332, wobei 11/29 (37,9%) positive Ergebnisse erbrachten. Sechs der 11 positiv getesteten Patienten (54,5%) wiesen sowohl eine Fluoreszenz in der Immunfluoreszenz, als auch mindestens ein positives ELISA-Ergebnis auf.
Statistisch signifikante Unterschiede der vier Gruppen mit Diabetes mellitus und/oder juckenden Hauterkrankungen und Patienten ohne Diabetes mellitus und ohne juckende Hauterkrankungen wurden nicht detektiert, weshalb schließlich kein Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus oder Juckreiz und Autoantikörperbildung gegen die Basalmembran abgeleitet wurde.

Die Studie von *Hofmann et al. [2009]* beschreibt bei 15 älteren Patienten (≥ 65 Jahre, 80,3 ± 10,7 Jahre) mit juckenden Dermatosen Autoantikörper gegen die

dermo-epidermalen Junktionszone. Allerdings wurden die Patienten zusätzlich nach sechs Monaten mittels BP180-NC16A-ELISA und indirekter Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut getestet. Dabei reagierten vier der 15 (26,7%) Probanden in der ersten, zwei (13,3%) in der zweiten Testung positiv im BP180-NC16A-ELISA, was keinen signifikanten Zusammenhang zum Juckreiz darstellte. Keiner der Patienten hatte ein positives Ergebnis in der indirekten Immunfluoreszenz oder entwickelte in der Beobachtungsphase ein bullöses Pemphigoid. Zu Beginn der Studie klagten alle Patienten über Juckreiz (Dauer 1,5-120 Monate), bei der zweiten Untersuchung lediglich 1/3 der Probanden. Bei diesen fand sich allerdings ein negativer Befund im ELISA, so dass auch hier kein Zusammenhang zum Juckreiz ersichtlich war. Die meisten der Patienten befanden sich nach den sechs Monaten in einer klinischen Remissionsphase. Als Kontrollgruppe dienten 34 Personen gemischten Alters ohne Juckreiz, von denen 6% (2/34) nur in der ersten Testung reagierten.
Die Autoren verzichten auf eine Interpretation der Ergebnisse mit Verweis auf die sehr geringe Populationsgröße.
Es ist außerdem darauf hinzuweisen, dass bei dieser Studie eine eigene Odds-Ratio gewählt wurde, die unterhalb der vom Hersteller vorgegebene Cut-off- Grenze liegt und somit niedrigere Antikörpertiter bewertete. Ferner zeigten die Titer einen absinkenden Verlauf. Die beiden Proben mit in beiden Testungen positiven Ergebnissen zählten mit 0,57 und 0,53 die höchsten Werte in der ersten Untersuchung. In der zweiten Testung nach sechs Monaten zeigten sie jeweils nur noch 0,4, so dass ein deutlicher Abfall zu verzeichnen ist. Die übrigen Werte (0,39/ 0,31) wären bei gleicher Abfallgeschwindigkeit unter den Cut-off von 0,3 gefallen. Somit ist anzunehmen, dass die Autoantikörpertiter rückläufig waren.

In einer prospektiv durchgeführten Studie kam *Rieckhoff-Cantoni et al. [1992]* dagegen zu dem Schluss, dass der Immunoblot niedrigere Titer von Autoantikörpern bei Patienten mit juckenden Dermatosen detektieren kann.
Bei der Untersuchung von 97 Patienten mit juckenden Dermatosen reagierten 24 (25%) in mindestens einem der Immunoblot. Bei sieben dieser Patienten wurde ein klassisches bullöses Pemphigoid, bei vier eine papulöse Variante des bullösen

Pemphigoid diagnostiziert, zwei litten an einem Ekzem, einer an Lichen planus und 10 Patienten hatten Juckreiz oder Prurigo unbekannter Genese. 13% der Patienten mit Autoantikörpern erfüllten nicht die bullösen Pemphigoid-Kriterien. Zur Kontrolle wurde eine 24 Seren starke Testgruppe mit dem gleichen Immunoblot-Verfahren (in diesem Falle das epidermale Extrakt) untersucht, wobei alle Ergebnisse negativ ausfielen. Die Autoren schlussfolgerten, dass ein frühzeitiger Nachweis von Autoantikörpern bei Patienten mit Juckreiz jedoch inkompletter Erfüllung der bullösen Pemphigoid-Kriterien im Immunoblot möglich ist.

In der vorliegenden Studie fand der dargestellte epidermale Blot keine Anwendung, ebenso wurde der hier als sensitivstes Testsystem dargestellte BP180-NC16A-ELISA bei der Arbeitsgruppe von Rieckhoff-Cantoni nicht getestet, somit ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse nicht möglich.

Auch *Hofmann et al. [2003]* berichtete über einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Autoantikörpern gegen die dermo-epidermale Junktionszone und Patienten mit Juckreiz.

In dieser retrospektiven Studie mit 25 alten Patienten (78,8 ± 15,5 Jahre) mit juckenden Hauterkrankungen ergab sich im MBL-BP180-NC16A-ELISA folgendes Bild: es fanden sich drei (12%) Patienten mit positivem Resultat, diese zeigten in der direkten und indirekten Immunfluoreszenz keine positiven Ergebnisse. Als Referenz wurden 11 Seren von Patienten mit atopischem Ekzem und 11 Seren von jungen (≤ 30Jahre) Gesunden gewählt, die alle keine Reaktivität aufwiesen. Von den Autoren wurde das folgendermaßen interpretiert: ursächlich für das Auftreten von Autoantikörpern sei der Juckreiz, für einen kleinen Teil der Patienten bestehe ein höheres Risiko im späteren Verlauf an einem bullösen Pemphigoid zu erkranken.

Das dargestellte Ergebnis ist allerdings statistisch nicht signifikant, auch hier besteht eine kleine Kohortengröße mit dem daraus resultierenden Problem bezüglich der Reliabilität und Validität. Auffällig waren außerdem die relativ niedrigen ELISA-Werte, die Reaktivität lag nur bei einem der drei Patienten oberhalb des Doppelten der unteren Nachweisgrenze, welche die Krankheitsaktivität widerspiegelt [Schmidt et al. 2000a].

Die Studie von *Feliciani et al. [2009]* beschrieb ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen Patienten mit Juckreiz und der Bildung von Autoantikörpern gegen die dermo-epidermale Junktionszone. Dabei wurden prospektiv 15 alte Patienten (76 ± 6 Jahre) mit akuten oder chronischen juckenden Dermatosen, 30 mit klinisch typischem bullösem Pemphigoid (74 ± 16 Jahre) und 25 Patienten (78 ± 3 Jahre) mit allergischen Erkrankungen (Urtikaria, allergische Rhinitis, Insekten-, Medikamentenallergie), die nicht unter blasenbildenden Hautläsionen litten, untersucht. Die Analyse von Antikörpern gegen BP180 (Subgruppen –ex, -N, -C) und BP230 (Subgruppen –C, -N) geschah mittels ELISA. Antikörperreaktionen konnten bei allen Patienten mit bullösem Pemphigoid, bei 8% (2/ 25) der Patienten mit allergischen Erkrankungen und 33% (5/ 15) der Patienten mit juckenden Dermatosen (5/ 15) nachgewiesen werden (80% BP230, 40% BP180).

Bei zwei der letztgenannten Patienten zeigten sich Autoantikörper gegen alle Fragmente des BP180. Autoantikörper speziell gegen das immundominante BP180-NC16A wurden dabei nicht bestimmt. Vier Patienten wiesen Autoantikörper gegen BP230 auf, wobei nur ein Patient in allen Subgruppen positive Ergebnisse erzielte. Er war auch der einzige Patient mit Autoantikörpern gegen BP180 und BP230. Alle reaktiven Seren dieser Gruppe wiesen im Gegensatz zur vorliegenden Studie, ohne Aufteilung in Subgruppen, auch Reaktivitäten in der indirekten Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut auf.

Zur Diskussion stellten die Autoren die Vermutung, dass bei Patienten mit juckenden Dermatosen und Autoantikörpern gegen BP230 ein Präpemphigoid in Frage kommen könnte. Ein Toleranzverslust gegenüber den Proteinen BP180 und BP230 könnte bei älteren Personen mit juckenden Dermatosen ursächlich sein.

Die Diskrepanz zu der hier vorgelegten Studie lässt sich durch die unterschiedlichen Populationsgrößen relativieren.

Interessant ist, dass, im Gegensatz zur vorliegenden Studie, die Patienten mit juckenden Hauterkrankungen in einem Zeitraum von 4-31 Monate bis zum Abklingen der Symptome beobachtet wurden: keiner entwickelte unter oder nach der Therapie (topischen Glukokortikoiden, mittlerer ultravioletten-(UV-B)-Bestrahlung,

systemischen Antihistaminika) Blasen, die Anzeichen auf den Beginn einer Autoimmundermatose wären. Es wäre aufschlussreich gewesen, den eventuell rückläufigen Autoantikörpertiter bei diesen Patienten zu beobachten.

Ausblick

Zukünftige Arbeiten sollten sich auf andere Faktoren konzentrieren, die an der Entstehung des bullösen Pemphigoid Anteil haben könnten. Dazu gehören wie bereits erwähnt: Medikamente (z.B. Aldosteron, Spironolakton oder bestimmte Neuroleptika [Bastuji-Garin et al. 1996; Bastuji-Garin et al. 2011]), Infektionen und neurologische Erkrankungen [Bastuji-Garin et al. 1996; Cordel et al. 2007; Mul et al. 2007].

Ferner wäre es sinnvoll, weitere prospektive Studien mit einer möglichst großen Patientenkohorte über mehrere Jahre zu führen. Das würde erlauben, auch einen geringen Einfluss des Juckreizes auf die Induktion eines bullösen Pemphigoid zu erfassen. Einschlusskriterien wären Juckreiz und ein positives Ergebnis im ELISA (BP180-NC16A/ BP230), da dieser das sensitivste Testverfahren für Serum-autoantikörper beim bullösen Pemphigoid ist. Zudem könnten halbjährliche klinische und serologische Verlaufskontrollen erfolgen. Bei Nachweis von Serumautoantikörpern sollte in allen Fällen ein bullöses Pemphigoid mittels direkter Immunfluoreszenz ausgeschlossen werden.

6 Zusammenfassung

Das bullöse Pemphigoid ist durch subepidermale Blasen und Autoantikörper gegen BP180 und BP230, Strukturproteine der dermo-epidermalen Junktionszone (DEJ), gekennzeichnet und die häufigste Blasen bildende Autoimmundermatose. Klinische Charakteristika des bullösen Pemphigoid, bei den zumeist älteren Patienten, sind pralle Blasen und der ausgeprägte Juckreiz, der praktisch bei allen Patienten besteht.

In dieser prospektiven, kontrollierten Studie wurde die Hypothese überprüft, ob Juckreiz, der möglicherweise zur Irritation der DEJ und nachfolgender Induktion einer Autoantikörperantwort gegen Strukturproteine der DEJ führt, mit dem Auftreten dieser Autoantikörper assoziiert ist.

Hierzu wurden 78 Seren von Patienten mit chronisch juckenden Dermatosen auf Autoantikörper gegen Strukturproteine der DEJ untersucht. Dabei wurden 12 verschiedene validierte serologische Testsysteme, die auch in der Routinediagnostik zum Einsatz kommen, angewandt: indirekte Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut, verschiedene kommerzielle ELISA-Verfahren (BP180-NC16A, BP230) sowie Immunoblot unter Verwendung von Überstand kultivierter humaner Keratinozyten (Ektodomäne von BP180), Extrakt kultivierter humaner Keratinozyten, extrazellulärer Matrix kultivierter humaner Keratinozyten (Laminin 332), Extrakt humaner Dermis (Typ VII Kollagen und p200 Protein) und rekombinantem BP180-NC16A.

Insgesamt konnten in 18 (23%) der 78 Seren Autoantikörper gegen die DEJ nachgewiesen werden. Wobei eine (1%) Reaktion im Immunoblot mit Extrakt kultivierter humaner Keratinozyten, je zwei (3%) in der indirekten Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut und im Immunoblot mit Überstand kultivierter humaner Keratinozyten beim Zweitantikörper IgG, vier (5%) im Immunoblot mit Überstand kultivierter humaner Keratinozyten beim Zweitantikörper IgA detektiert wurden. Im ELISA reagierten acht (10%) Patienten gegen BP180-NA16A (Euroimmun n = 5, 6%; MBL n = 6, 8%) und drei (4%) Patienten gegen BP230 (Euroimmun n = 1, 1%; MBL n = 3, 4%).

Drei (4%) Patienten reagierten in mehr als einem Testverfahren, wobei zwei (3%) davon in beiden BP180-NC16A-ELISA und ein (1%) Patient in allen ELISA beider Hersteller und in der indirekten Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut reagierte.
Bei fünf der zehn Patienten mit Reaktivitäten im ELISA konnte ein Wert oberhalb des Doppelten der unteren Nachweisgrenze gemessen werden.
Die direkte Immunfluoreszenz einer bei diesen Patienten post hoc durchgeführten periläsionalen Probebiopsie, der diagnostische Goldstandard des bullösen Pemphigoid, war bei allen Patienten negativ.

Im Vergleich mit den bereits vorliegenden Daten zweier Kontrollkohorten, Blutspendern (n = 50) und altersgleichen stationären Patienten ohne entzündliche Hauterkrankungen (n = 93) ergab sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Patienten mit chronischem Juckreiz hinsichtlich der Reaktivität mit Strukturproteinen der DEJ.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit chronischem Juckreiz kein erhöhtes Risiko haben, Autoantikörper gegen Strukturproteine der DEJ zu entwickeln. Zumindest ist das Risiko so klein, dass es im klinischen Alltag nicht relevant sein sollte.
Basierend auf diesen Daten wird empfohlen, bei Patienten mit länger bestehendem Juckreiz ein bullöses Pemphigoid zunächst serologisch auszuschließen. Bei positiven Befunden, vor allem bei Reaktivität in mehr als einem Nachweissystem oder Autoantikörperspiegeln deutlich über der unteren Nachweisgrenze, sollte eine direkte Immunfluoreszenz durchgeführt werden, um ein bullöses Pemphigoid sicher auszuschließen oder es zu diagnostizieren.

7 Literaturverzeichnis

Amato DA, Silverstein J, Zitelli J. The prodrome of bullous pemphigoid. Int. J. Dermatol. 1988 Okt; 27(8):560-563.

Ambach A, Zillikens D, Klingert B, Hartmann A, Burg G. Immunphänotypisierung des mononukläre Infiltrats beim bullösen Pemphigoid. Hautarzt. 1992; (43):81–85.

Anhalt GJ, Morrison LH. Bullous and cicatricial pemphigoid. J. Autoimmun. 1991 Feb; 4(1):17–35.

Basset-Séguin N, Caughman SW, Yancey KB. A-431 cells and human keratinocytes synthesize and secrete the third component of complement. J. Invest. Dermatol. 1990 Dez; 95(6):621-625.

Bastuji-Garin S, Joly P, Picard-Dahan C, Bernard P, Vaillant L, Pauwels C, Salagnac V, Lok C, Roujeau JC. Drugs associated with bullous pemphigoid. A case-control study. Arch. Dermatol. 1996 Mär; 132(3):272-276.

Bastuji-Garin S, Joly P, Lemordant P, Sparsa A, Bedane C, Delaporte E, Roujeau J-C, Bernard P, Guillaume J-C, Ingen-Housz-Oro S, Maillard H, Pauwels C, Picard-Dahan C, Dutronc Y, Richard M-A. Risk factors for bullous pemphigoid in the elderly: a prospective case-control study. J. Invest. Dermatol. 2011 Mär; 131(3):637-643.

Bernard P, Prost C, Lecerf V, Intrator L, Combemale P, Bedane C, Roujeau JC, Revuz J, Bonnetblanc JM, Dubertret L. Studies of cicatricial pemphigoid autoantibodies using direct immunoelectron microscopy and immunoblot analysis. J. Invest. Dermatol. 1990 Mai; 94(5):630–635.

Bertram F, Bröcker E, Zillikens D, Schmidt E. Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. J. Dtsch. Dermatol. Ges. 2009 Mai; 7(5):434-440.

Bieber K, Sun S, Ishii N, Kasperkiewicz M, Schmidt E, Hirose M, Westermann J, Yu X, Zillikens D, Ludwig RJ. Animal models for autoimmune bullous dermatoses. Exp. Dermatol. 2010 Jan; 19(1):2-11.

Blöcker IM, Dähnrich C, Probst C, Komorowski L, Saschenbrecker S, Schlumberger W, Stöcker W, Zillikens D, Schmidt E. Epitope mapping of BP230 leading to a novel enzyme-linked immunosorbent assay for autoantibodies in bullous pemphigoid. Br. J. Dermatol. 2012 Mai; 166(5):964-70.

Borradori L, Sonnenberg A. Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. J. Invest. Dermatol. 1999 Apr; 112(4):411-418.

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. J. Cell. Biol. 1988 Mär; 106(3):761-771.

Bushkell LL, Jordon RE. Bullous pemphigoid: a cause of peripheral blood eosinophilia. J. Am. Acad. Dermatol. 1983 Mai; 8(5):648-651.

Chan Y, Sun Y, Ng PP, Tan S. Comparison of immunofluorescence microscopy, immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay methods in the laboratory diagnosis of bullous pemphigoid. Clin. Exp. Dermatol. 2003 Nov; 28(6):651-656.

Chimanovitch I, Hamm H, Georgi M, Kroiss M, Stolz W, Apitz C, Bröcker EB, Zillikens D. Bullous pemphigoid of childhood: autoantibodies target the same epitopes within the NC16A domain of BP180 as autoantibodies in bullous pemphigoid of adulthood. Arch. Dermatol. 2000 Apr; 136(4):527-532.

Cordel N, Chosidow O, Hellot M-F, Delaporte E, Lok C, Vaillant L, Bernard P, D'Incan M, Roujeau JC, Joly P. Neurological disorders in patients with bullous pemphigoid. Dermatology (Basel). 2007; 215(3):187–191.

Damoiseaux J, van Rijsingen M, Warnemünde N, Dähnrich C, Fechner K, Tervaert JW. Autoantibody detection in bullous pemphigoid: clinical evaluation of the EUROPLUS™ Dermatology Mosaic. J. Immunol. Methods. 2012 Aug 31; 382(1-2):76-80.

Davis AL, Bhogal BS, Whitehead P, Frith P, Murdoch ME, Leigh IM, Wojnarowska F. Lichen planus pemphigoides: its relationship to bullous pemphigoid. Br. J. Dermatol. 1991 Sep; 125(3):263–271.

Desai N, Allen J, Ali I, Venning V, Wojnarowska F. Autoantibodies to basement membrane proteins BP180 and BP230 are commonly detected in normal subjects by immunoblotting. Australas. J. Dermatol. 2008 Aug; 49(3):137-141.

Di Zenzo G, Grosso F, Terracina M, Mariotti F, De Pità O, Owaribe K, Mastrogiacomo A, Sera F, Borradori L, Zambruno G. Characterization of the anti-BP180 autoantibody reactivity profile and epitope mapping in bullous pemphigoid patients. J. Invest. Dermatol. 2004 Jan; 122(1):103-110.

Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Calabresi V, Fontao L, Hofmann SC, Lacour JP, Sera F, Bruckner-Tuderman L, Zambruno G, Borradori L, Hertl M. Demonstration of epitope-spreading phenomena in bullous pemphigoid: results of a prospective multicenter study. J. Invest. Dermatol. 2011 Nov; 131(11):2271-80

Domloge-Hultsch N, Gammon WR, Briggaman RA, Gil SG, Carter WG, Yancey KB. Epiligrin, the major human keratinocyte integrin ligand, is a target in both an acquired autoimmune and an inherited subepidermal blistering skin disease. J. Clin. Invest. 1992 Okt; 90(4):1628-1633.

Döpp R, Schmidt E, Chimanovitch I, Leverkus M, Bröcker EB, Zillikens D. IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in Bullous pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. J. Am. Acad. Dermatol. 2000 Apr; 42(4):577-583.

Dubben HH, Beck-Bornholdt HP. Die Bedeutung der statistischen Signifikanz. In: Diekmann, A (Hrsg.) Methoden der Sozialforschung. Sonderheft 44 der Kölner Zeitschrift für Soziologie und Sozialpsychologie. Wiesbaden: VS-Verlag für Sozialwissenschaften. 2006; p. 61-74

Durkin ME, Loechel F, Mattei MG, Gilpin BJ, Albrechtsen R, Wewer UM. Tissue-specific expression of the human laminin alpha5-chain, and mapping of the gene to human chromosome 20q13.2-13.3 and to distal mouse chromosome 2 near the locus for the ragged (Ra) mutation. FEBS. Lett. 1997 Jul; 411(2-3):296-300.

Feliciani C, Caldarola G, Kneisel A, Podstawa E, Pfütze M, Pfützner W, Hertl M. IgG autoantibody reactivity against bullous pemphigoid (BP) 180 and BP230 in elderly patients with pruritic dermatoses. Br. J. Dermatol. 2009 Aug; 161(2):306-312.

Feng S, Wu Q, Jin P, Lin L, Zhou W, Sang H, Shao C. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. Int. J. Dermatol. 2008 Mär; 47(3):225-228.

Fivenson DP, Breneman DL, Rosen GB, Hersh CS, Cardone S, Mutasim D. Nicotinamide and tetracycline therapy of bullous pemphigoid. Arch. Dermatol. 1994 Jun; 130(6):753-758.

Foureur N, Mignot S, Senet P, Verpillat P, Picard-Dahan C, Crickx B, Labarre C, Nicaise-Roland P, Descamps V. Correlation between the presence of type-2 anti-pemphigoid antibodies and dementia in elderly subjects with no clinical signs of pemphigoid. Ann. Dermatol. Venereol. 2006 Mai; 133(5 Pt 1):439-43.

Gammon WR, Merritt CC, Lewis DM, Sams WM, Carlo JR, Wheeler CE. An in vitro model of immune complex-mediated basement membrane zone separation caused by pemphigoid antibodies, leukocytes, and complement. J. Invest. Dermatol. 1982 Apr; 78(4):285-290.

Gammon WR, Briggaman RA, Inman AO 3rd, Queen LL, Wheeler CE. Differentiating anti-lamina lucida and anti-sublamina densa anti-BMZ antibodies by indirect immunofluorescence on 1.0 M sodium chloride-separated skin. J. Invest. Dermatol. 1984 Feb; 82(2):139-144.

Gengoux P, Lachapelle JM. Pemphigoid presenting as atypical excoriated prurigo: regarding 11 cases. Dermatology (Basel). 1997; 194(4):392–394.

Georgi M, Scheckenbach C, Kromminga A, Partscht K, Messer G, Bröcker EB, Zillikens D. Mapping of epitopes on the BP180 ectodomain targeted by IgA and IgG autoantibodies in patients with the lamina lucida-type of linear IgA disease. Arch. Dermatol. Res. 2001 Mär; 293(3):109–114.

Ghohestani R, Kanitakis J, Nicolas JF, Cozzani E, Claudy A. Comparative sensitivity of indirect immunofluorescence to immunoblot assay for the detection of circulating antibodies to bullous pemphigoid antigens 1 and 2. Br. J. Dermatol. 1996 Jul; 135(1):74-79.

Ghohestani RF, Nicolas JF, Rousselle P, Claudy AL. Diagnostic value of indirect immunofluorescence on sodium chloride-split skin in differential diagnosis of subepidermal autoimmune bullous dermatoses. Arch. Dermatol. 1997 Sep; 133(9):1102–1107.

Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA. Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. J. Invest. Dermatol. 1992 Sep; 99(3):243-250.

Green MA, Sviland L, Malcolm AJ, Pearson AD. Improved method for immunoperoxidase detection of membrane antigens in frozen sections. J. Clin. Pathol. 1989 Aug; 42(8):875-880.

Gudi VS, White MI, Cruickshank N, Herriot R, Edwards SL, Nimmo F, Ormerod AD. Annual incidence and mortality of bullous pemphigoid in the Grampian Region of North-east Scotland. Br. J. Dermatol. 2005 Aug; 153(2):424–427.

Haase C, Büdinger L, Borradori L, Yee C, Merk HF, Yancey K, Hertl M. Detection of IgG autoantibodies in the sera of patients with bullous and gestational pemphigoid: ELISA studies utilizing a baculovirus-encoded form of bullous pemphigoid antigen 2. J. Invest. Dermatol. 1998 Mär; 110(3):282-286.

Hachisuka H, Kurose K, Karashima T, Mori O, Maeyama Y. Serum from normal elderly individuals contains anti-basement membrane zone antibodies. Arch. Dermatol. 1996 Okt; 132(10):1201-1205.

Hata Y, Fujii Y, Tsunoda K, Amagai M. Production of the entire extracellular domain of BP180 (type XVII collagen) by baculovirus expression. J. Dermatol. Sci. 2000 Aug; 23(3):183-190.

Helenius A, Simons K. Solubilization of membranes by detergents. Biochim. Biophys. Acta. 1975 Mär; 415(1):29-79.

Hirako Y, Usukura J, Uematsu J, Hashimoto T, Kitajima Y, Owaribe K. Cleavage of BP180, a 180-kDa bullous pemphigoid antigen, yields a 120-kDa collagenous extracellular polypeptide. J. Biol. Chem. 1998 Apr; 273(16):9711-9717.

Hirako Y, Nishizawa Y, Sitaru C, Opitz A, Marcus K, Meyer HE, Butt E, Owaribe K, Zillikens D. The 97-kDa (LABD97) and 120-kDa (LAD-1) fragments of bullous pemphigoid antigen 180/type XVII collagen have different N-termini. J. Invest. Dermatol. 2003 Dez; 121(6):1554-1556.

Hofmann SC, Tamm K, Hertl M, Borradori L. Diagnostic value of an enzyme-linked immunosorbent assay using BP180 recombinant proteins in elderly patients with pruritic skin disorders. Br. J. Dermatol. 2003 Okt; 149(4):910-912.

Hofmann SC, Otto C, Bruckner-Tuderman L, Borradori L. Isolated NC16a-ELISA testing is of little value to identify bullous pemphigoid in elderly patients with chronic pruritus. Eur. J. Dermatol. 2009 Dez; 19(6):634-635.

Hornschuh B, Hamm H, Wever S, Hashimoto T, Schröder U, Bröcker EB, Zillikens D. Treatment of 16 patients with bullous pemphigoid with oral tetracycline and niacinamide and topical clobetasol. J. Am. Acad. Dermatol. 1997 Jan; 36(1):101-103.

Ide A, Hashimoto T, Amagai M, Tanaka M, Nishikawa T. Detection of autoantibodies against bullous pemphigoid and pemphigus antigens by an enzyme-linked immunosorbent assay using the bacterial recombinant proteins. Exp. Dermatol. 1995 Apr; 4(2):112-116.

Jedlickova H, Racovska J, Niedermeier A, Feit J, Hertl M. Anti-basement membrane zone antibodies in elderly patients with pruritic disorders and diabetes mellitus. Eur. J. Dermatol. 2008 Okt; 18(5):534-538.

Joly P, Benichou J, Lok C, Hellot MF, Saiag P, Tancrede-Bohin E, Sassolas B, Labeille B, Doutre MS, Gorin I, Pauwels C, Chosidow O, Caux F, Estève E, Dutronc Y, Sigal M, Prost C, Maillard H, Guillaume JC, Roujeau JC. Prediction of survival for patients with bullous pemphigoid: a prospective study. Arch. Dermatol. 2005 Jun; 141(6):691-698.

Joly P, Baricault S, Sparsa A, Bernard P, Bédane C, Duvert-Lehembre S, Courville P, Bravard P, Rémond B, Doffoel-Hantz V, Bénichou J. Incidence and mortality of bullous pemphigoid in France. J. Invest. Dermatol. 2012 Aug; 132(8):1998–2004.

Jordon RE, Beutner EH, Witebsky E, Blumental G, Hale WL, Lever WF. Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. JAMA. 1967 Mai; 200(9):751-756.

Jordon RE, Kawana S, Fritz KA. Immunopathologic mechanisms in pemphigus and bullous pemphigoid. J. Invest. Dermatol. 1985 Jul; 85(1 Suppl):72s-78s.

Jung M, Kippes W, Messer G, Zillikens D, Rzany B. Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence. J. Am. Acad. Dermatol. 1999 Aug; 41(2 Pt 1):266-268.

Kasperkiewicz M, Zillikens D, Schmidt E. Pemphigoid diseases: Pathogenesis, diagnosis, and treatment. Autoimmunity. 2012 Feb; 45(1):55-70

Kelly SE, Wojnarowska F. The use of chemically split tissue in the detection of circulating anti-basement membrane zone antibodies in bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid. Br. J. Dermatol. 1988 Jan; 118(1):31-40.

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

Kneisel A, Hertl M. Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: diagnosis and therapy. J. Dtsch. Dermatol. Ges 2011 Nov; 9(11):927-947.

Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Nishikawa T. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. J. Dermatol. Sci. 2002 Dez; 30(3):224-32.

Korman NJ. Bullous pemphigoid. The latest in diagnosis, prognosis, and therapy. Arch. Dermatol. 1998 Sep; 134(9):1137-1141.

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

Kricka LJ, Thorpe GHG, Stott RAW. Enhanced chemiluminescence enzyme immunoassay. Pure. Appl. Chem. 1987; 59(5):651-654.

Kromminga A, Scheckenbach C, Georgi M, Hagel C, Arndt R, Christophers E, Bröcker EB, Zillikens D. Patients with bullous pemphigoid and linear IgA disease show a dual IgA and IgG autoimmune response to BP180. J. Autoimmun. 2000 Nov; 15(3):293-300.

Kromminga A, Sitaru C, Hagel C, Herzog S, Zillikens D. Development of an ELISA for the detection of autoantibodies to BP230. Clin. Immunol. 2004 Apr; 111(1):146-152.

Kyhse-Andersen J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J. Biochem. Biophys. Methods. 1984 Dez; 10(3-4):203-209.

Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, Mutasim DF, Diaz LA. Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. J. Immunol. 1986 Feb; 136(4):1231-1235.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug; 227(5259):680-685.

Laffitte E. Bullous pemphigiod and related disorders. In: Hertl M (Hrsg.), Autoimmune diseases of the skin: pathogenesis, diagnosis, management. Wien; New York: Springer; 2001

Lamb PM, Abell E, Tharp M, Frye R, Deng J. Prodromal bullous pemphigoid. Int. J. Dermatol. 2006 Mär; 45(3):209-214.

Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJP, West J. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. BMJ. 2008; 337:a180.

Lazarova Z, Sitaru, C, Zillikens D, Yancey KB. Comparative analysis of methods for detection of anti-laminin 5 autoantibodies in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid. J. Am. Acad. Dermatol. 2004 Dez; 51(6):886-92.

Leverkus M, Schmidt E, Lazarova Z, Bröcker EB, Yancey KB, Zillikens D. Antiepiligrin cicatricial pemphigoid: an underdiagnosed entity within the spectrum of scarring autoimmune subepidermal bullous diseases? Arch. Dermatol. 1999 Sep; 135(9):1091-1098.

Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, Giudice GJ. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. J. Clin. Invest. 1993 Nov; 92(5):2480-2488.

Liu Z, Diaz LA, Swartz SJ, Troy JL, Fairley JA, Giudice GJ. Molecular mapping of a pathogenically relevant BP180 epitope associated with experimentally induced murine bullous pemphigoid. J. Immunol. 1995 Dez; 155(11):5449-5454.

Liu Z, Giudice GJ, Zhou X, Swartz SJ, Troy JL, Fairley JA, Till GO, Diaz LA. A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid. J. Clin. Invest. 1997 Sep; 100(5):1256-1263.

Liu Z, Shipley JM, Vu TH, Zhou X, Diaz LA, Werb Z, Senior RM. Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid. J. Exp. Med. 1998 Aug; 188(3):475-482.

Machado P, Michalaki H, Roche P, Gaucherand M, Thivolet J, Nicolas JF. Serological diagnosis of bullous pemphigoid (BP): comparison of the sensitivity of indirect immunofluorescence on salt-split skin to immunoblotting. Br. J. Dermatol. 1992 Mär; 126(3):236–241.

Marazza G, Pham HC, Schärer L, Pedrazzetti PP, Hunziker T, Trüeb RM, Hohl D, Itin P, Lautenschlager S, Naldi L, Borradori L. Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study. Br. J. Dermatol. 2009 Okt; 161(4):861-868.

Marinkovich MP, Taylor TB, Keene DR, Burgeson RE, Zone JJ. LAD-1, the linear IgA bullous dermatosis autoantigen, is a novel 120-kDa anchoring filament protein synthesized by epidermal cells. J. Invest. Dermatol. 1996 Apr; 106(4):734-738.

Mariotti F, Grosso F, Terracina M, Ruffelli M, Cordiali-Fei P, Sera F, Zambruno G, Mastrogiacomo A, Di Zenzo G. Development of a novel ELISA system for detection of anti-BP180 IgG and characterization of autoantibody profile in bullous pemphigoid patients. Br. J. Dermatol. 2004 Nov; 151(5):1004–1010.

Masunaga T, Shimizu H, Yee C, Borradori L, Lazarova Z, Nishikawa T, Yancey KB. The extracellular domain of BPAG2 localizes to anchoring filaments and its carboxyl terminus extends to the lamina densa of normal human epidermal basement membrane. J. Invest. Dermatol. 1997 Aug; 109(2):200-206.

Miller JE, Rico MJ, Hall RP. IgG antibodies from patients with bullous pemphigoid bind to fusion proteins encoded by BPAg1 cDNA. J. Invest. Dermatol. 1993 Dez; 101(6):779-782.

Moll R, Moll I. Epidermal adhesion molecules and basement membrane components as target structures of autoimmunity. Virchows. Arch. 1998 Jun; 432(6):487-504.

Mora RG, Nesbitt LT Jr, Brantley JB. Lichen planus pemphigoides: clinical and immunofluorescent findings in four cases. J. Am. Acad. Dermatol. 1983 Mär; 8(3):331–336.

Motoki K, Megahed M, LaForgia S, Uitto J. Cloning and chromosomal mapping of mouse ladinin, a novel basement membrane zone component. Genomics. 1997 Feb; 39(3):323-330.

Mul VEM, van Geest AJ, Pijls-Johannesma MCG, Theys J, Verschueren TAM, Jager JJ, Lambin P, Baumert BG. Radiation-induced bullous pemphigoid: a systematic review of an unusual radiation side effect. Radiother. Oncol. 2007 Jan; 82(1):5–9.

Murakami H, Amagai M, Higashiyama M, Hashimoto K, Chorzelski TP, Bhogal BS, Jenkins RE, Black MM, Zillikens D, Nishikawa T, Hashimoto T. Analysis of antigens recognized by autoantibodies in herpes gestationis. Usefulness of immunoblotting using a fusion protein representing an extracellular domain of the 180 kD bullous pemphigoid antigen. J. Dermatol. Sci. 1996 Nov; 13(2):112-117.

Mutasim DF, Bilic M, Hawayek LH, Pipitone MA, Sluzevich JC. Immunobullous diseases. J. Am. Acad. Dermatol. 2005 Jun; 52(6):1029-1043.

Naito K, Morioka S, Ogawa H. The pathogenic mechanisms of blister formation in bullous pemphigoid. J. Invest. Dermatol. 1982 Nov; 79(5):303-306.

Nakatani C, Muramatsu T, Shirai T. Immunoreactivity of bullous pemphigoid (BP) autoantibodies against the NC16A and C-terminal domains of the 180 kDa BP antigen (BP180): immunoblot analysis and enzyme-linked immunosorbent assay using BP180 recombinant proteins. Br. J. Dermatol. 1998 Sep; 139(3):365–370.

Nishie W, Lamer S, Schlosser A, Licarete E, Franzke C, Hofmann SC, Jackow J, Sitaru C, Bruckner-Tuderman L. Ectodomain shedding generates Neoepitopes on collagen XVII, the major autoantigen for bullous pemphigoid. J. Immunol. 2010 Okt; 185(8):4938-4947.

Nousari HC, Griffin WA, Anhalt GJ. Successful therapy for bullous pemphigoid with mycophenolate mofetil. J. Am. Acad. Dermatol. 1998 Sep; 39(3):497-498.

Olivry T, Bizikova P, Dunston SM, Bond R, Halliwell R, Loeffler A, Pucheu-Haston CM, Chen M, Marinkovich MP. Clinical and immunological heterogeneity of canine subepidermal blistering dermatoses with anti-laminin-332 (laminin-5) auto-antibodies. Vet. Dermatol. 2010 Aug; 21(4): 345–357.

Oyama N, Setterfield JF, Powell AM, Sakuma-Oyama Y, Albert S, Bhogal BS, Vaughan RW, Kaneko F, Challacombe SJ, Black MM. Bullous pemphigoid antigen II (BP180) and its soluble extracellular domains are major autoantigens in mucous membrane pemphigoid: the pathogenic relevance to HLA class II alleles and disease severity. Br. J. Dermatol. 2006 Jan; 154(1):90-8.

Parodi A, Rebora A. Serum IgE antibodies bind to the epidermal side of the basement membrane zone splits in bullous pemphigoid. Br. J. Dermatol. 1992 Mai; 126(5):526-527.

Pas HH, de Jong MC, Jonkman MF, Heeres K, Slijper-Pal IJ, van der Meer JB. Bullous pemphigoid: serum antibody titre and antigen specificity. Exp. Dermatol. 1995 Dez; 4(6):372-376.

Pas HH, Kloosterhuis GJ, Heeres K, van der Meer JB, Jonkman MF. Bullous pemphigoid and linear IgA dermatosis sera recognize a similar 120-kDa keratinocyte collagenous glycoprotein with antigenic cross-reactivity to BP180. J. Invest. Dermatol. 1997 Apr; 108(4):423-429.

Person JR, Rogers RS. Bullous pemphigoid responding to sulfapyridine and the sulfones. Arch. Dermatol. 1977 Mai; 113(5):610-615.

Powell AM, Albert S, Gratian MJ, Bittencourt R, Bhogal BS, Black MM. Pemphigoid nodularis (non-bullous): a clinicopathological study of five cases. Br. J. Dermatol. 2002 Aug; 147(2):343-349.

Rieckhoff-Cantoni L, Bernard P, Didierjean L, Imhof K, Kinloch-de Loës S, Saurat JH. Frequency of bullous pemphigoid-like antibodies as detected by western immunoblot analysis in pruritic dermatoses. Arch. Dermatol. 1992 Jun; 128(6):791-794.

Roh JY, Yee C, Lazarova Z, Hall RP, Yancey KB. The 120-kDa soluble ectodomain of type XVII collagen is recognized by autoantibodies in patients with pemphigoid and linear IgA dermatosis. Br. J. Dermatol. 2000 Jul; 143(1):104–111.

Rose E, Kasperkiewicz M, Rose C, Zillikens D. Bullöse Autoimmundermatosen Neues zur Diagnostik und Therapie. Der Deutsche Dermatologe. 2007 Sep; (9·2007):617-23.

Roujeau JC, Lok C, Bastuji-Garin S, Mhalla S, Enginger V, Bernard P. High risk of death in elderly patients with extensive bullous pemphigoid. Arch. Dermatol. 1998 Apr; 134(4):465-469.

Rzany B, Partscht K, Jung M, Kippes W, Mecking D, Baima B, Prudlo C, Pawelczyk B, Messmer EM, Schuhmann M, Sinkgraven R, Büchner L, Büdinger L, Pfeiffer C, Sticherling M, Hertl M, Kaiser HW, Meurer M, Zillikens D, Messer G. Risk Factors for Lethal Outcome in Patients With Bullous Pemphigoid. Arch. Dermatol. 2002 Jul; 138(7): 903 - 908

Sakuma-Oyama Y, Powell AM, Oyama N, Albert S, Bhogal BS, Black MM. Evaluation of a BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assay in the initial diagnosis of bullous pemphigoid. Br. J. Dermatol. 2004 Jul; 151(1):126-131.

Schäcke H, Schumann H, Hammami-Hauasli N, Raghunath M, Bruckner-Tuderman L. Two forms of collagen XVII in keratinocytes. A full-length transmembrane protein and a soluble ectodomain. J. Biol. Chem. 1998 Okt; 273(40):25937-25943.

Schmidt E, Bröcker EB, Zillikens D. High levels of soluble CD23 in blister fluid of patients with bullous pemphigoid. Arch. Dermatol. 1995 Aug; 131(8):966-967.

Schmidt E, Bröcker EB, Zillikens D. Neue Aspekte zur Pathogenese des bullösen Pemphigoids. Hautarzt. 2000a Nov; (51):637-45.

Schmidt E, Obe K, Bröcker EB, Zillikens D. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. Arch. Dermatol. 2000b Feb; 136(2):174-178.

Schmidt E, Skrobek C, Kromminga A, Hashimoto T, Messer G, Bröcker EB, Yancey KB, Zillikens D. Cicatricial pemphigoid: IgA and IgG autoantibodies target epitopes on both intra- and extracellular domains of bullous pemphigoid antigen 180. Br. J. Dermatol. 2001 Nov; 145(5):778–783.

Schmidt E, Kromminga A, Mimietz S, Leinfelder U, Sitaru C, Bröcker E, Zillikens D, Zimmermann U. A highly sensitive and simple assay for the detection of circulating autoantibodies against full-length bullous pemphigoid antigen 180. J. Autoimmun. 2002a Jun; 18(4):299-309.

Schmidt E, Sitaru C, Schubert B, Wesselmann U, Kromminga A, Bröcker E-B, Zillikens D. Subacute prurigo variant of bullous pemphigoid: autoantibodies show the same specificity compared with classic bullous pemphigoid. J. Am. Acad. Dermatol. 2002b Jul; 47(1):133–136.

Schmidt E, Zillikens D. Research in practice: diagnosis of subepidermal autoimmune bullous disorders. J. Dtsch. Dermatol. Ges. 2009a; 7(4):296-300.

Schmidt E, Zillikens D. Diagnosis and clinical severity markers of bullous pemphigoid F1000. Med. Rep. 2009b; 1

Schmidt E, Zillikens D. Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. Autoimmunity. Reviews. 2010 Dez; 10:84-89.

Schmidt E, Zillikens D. Diagnostik und Therapie bullöser Autoimmundermatosen. Dtsch. Ärztebl. 2011 Jun; 108(23):399-405.

Schmidt E, della Torre R, Borradori L. Clinical features and practical diagnosis of bullous pemphigoid. Dermatol. Clin. 2011 Jul; 29(3):427-38

Schmidt E, Zillikens D. Pemphigoid diseases. Lancet. 2013 Jan 26; 381(9863):320-32.

Schumann H, Baetge J, Tasanen K, Wojnarowska F, Schäcke H, Zillikens D, Bruckner-Tuderman L. The shed ectodomain of collagen XVII/BP180 is targeted by autoantibodies in different blistering skin diseases. Am. J. Pathol. 2000 Feb; 156(2): 685-695.

Shimanovich I, Mihai S, Oostingh GJ, Ilenchuk TT, Bröcker E, Opdenakker G, Zillikens D, Sitaru C. Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. J. Pathol. 2004 Dez; 204(5): 519-527.

Sitaru C, Kromminga A, Hashimoto T, Bröcker EB, Zillikens D. Autoantibodies to type VII collagen mediate Fcgamma-dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. Am. J. Pathol. 2002a Jul; 161(1):301-311.

Sitaru C, Schmidt E, Petermann S, Munteanu LS, Bröcker E, Zillikens D. Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. J. Invest. Dermatol. 2002b Apr; 118(4):664-671.

Sitaru C, Dähnrich C, Probst C, Komorowski L, Blöcker I, Schmidt E, Schlumberger W, Rose C, Stöcker W, Zillikens D. Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies. Exp. Dermatol. 2007 Sep; 16(9):770-777.

Ständer S, Schäfer I, Phan NQ, Blome C, Herberger K, Heigel H, Augustin M. Prevalence of chronic pruritus in Germany: results of a cross-sectional study in a sample working population of 11,730. Dermatology (Basel). 2010; 221(3):229–235.

Stanley JR, Hawley-Nelson P, Yuspa SH, Shevach EM, Katz SI. Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. Cell. 1981 Jun; 24(3):897-903.

Tamada Y, Yokochi K, Oshitani Y, Nitta Y, Ikeya T, Hara K, Owaribe K. Pemphigoid nodularis: a case with 230 kDa hemidesmosomes antigen associated with bullous pemphigoid antigen. J. Dermatol. 1995 Mär; 22(3):201-204.

Tashiro H, Arai H, Hashimoto T, Takezaki S, Kawana S. Pemphigoid nodularis: two case studies and analysis of autoantibodies before and after the development of generalized blistering. J. Nippon. Med. Sch. 2005 Feb; 72(1):60–65

Thaipisuttikul Y. Pruritic skin diseases in the elderly. J. Dermatol. 1998 Mär; 25(3):153-157.

Thoma-Uszynski S, Uter W, Schwietzke S, Hofmann SC, Hunziker T, Bernard P, Treudler R, Zouboulis CC, Schuler G, Borradori L, Hertl M. BP230- and BP180-specific auto-antibodies in bullous pemphigoid. J. Invest. Dermatol. 2004 Jun; 122(6):1413-1422.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. Biotechnology. 1992; 24:145-149.

Van Beek N, Knuth-Rehr D, Altmeyer P, Assaf C, Babilas P, Bayerl C, Benoit S, Dippel E, Effendy I, Eming R, Fischer M, Glaenz T, Gläser R, Goebeler M, Gollnick H, Götze S, Gross G, Hadaschik E, Herbst R, Hermes B, Homey B, Hunzelmann N, Jünger M, Kapp A, Kern JS, Körber A, Luger T, Mechtel D, Megahed M, Moll I, Peters KP, Pfeiffer C, Ring J, Röcken M, Sárdy M, Seitz CS, Stadler R, Steinbrink K, Sticherling M, Szeimies RM, Tronnier M, Ulrich J, Vogt T, Wagner N, Welzel J, Wenzel J, Wozel G, Zouboulis CC, Zillikens D, Schmidt E. Diagnostics of autoimmune bullous diseases in German dermatology departments. J. Dtsch. Dermatol. Ges. 2012 Jul; 10(7):492-9.

Van Beek N, Dohse A, Riechert F, Krull V, Recke A, Zillikens D, Schmidt E. Serum autoantibodies against the dermal-epidermal junction in patients with chronic pruritic disorders, elderly individuals, and blood donors prospectively recruited. Br. J. Dermatol. 2014, im Druck.

Venning VA, Millard PR, Wojnarowska F. Dapsone as first line therapy for bullous pemphigoid. Br. J. Dermatol. 1989 Jan; 120(1):83-92.

Wever S, Rank C, Hornschuh B, Hashimoto T, Nishikawa T, Bröcker E, Zillikens D. Bullöses Pemphigoid unter dem Bild einer Prurigo simplex subacuta. Hautarzt. 1995; 46(11):789-795.

Wieland CN, Comfere NI, Gibson LE, Weaver AL, Krause PK, Murray JA. Anti-bullous pemphigoid 180 and 230 antibodies in a sample of unaffected subjects. Arch. Dermatol. 2010 Jan; 146(1):21-25.

Widmer R, Ziaja I, Grune T. Protein oxidation and degradation during aging: role in skin aging and neurodegeneration. Free. Radic. Res. 2006 Dez; 40(12):1259-68.

Willsteed E, Bhogal BS, Black MM, McKee P, Wojnarowska F. Use of 1M NaCl split skin in the indirect immunofluorescence of the linear IgA bullous dermatoses. J. Cutan. Pathol. 1990 Jun; 17(3):144–148.

Wolz MM, Comfere NI, Gibson LE, Wieland CN. Anti-bullous pemphigoid 180 and 230 antibodies in asymptomatic subjects: five-year follow-up. J. Am. Acad. Dermatol. 2013 Apr; 68(4):686-7.

Yancey KB. The pathophysiology of autoimmune blistering diseases. J. Clin. Invest. 2005 Apr; 115(4):825-828.

Yoshida M, Hamada T, Amagai M, Hashimoto K, Uehara R, Yamaguchi K, Imamura K, Okamoto E, Yasumoto S, Hashimoto T. Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. J. Dermatol. Sci. 2006 Jan; 41(1):21-30.

Zillikens D, Ambach A, Schuessler M, Dummer R, Hartmann AA, Burg G. The interleukin-2 receptor in lesions and serum of bullous pemphigoid. Arch. Dermatol. Res. 1992; 284(3):141-145.

Zillikens, D, Giudice, GJ, Diaz LA. Bullous pemphigoid: an autoimmune blistering disease of the elderly. J. Geriatr. Dermatol. 1996a; (4):35–41.

Zillikens D, Kawahara Y, Ishiko A, Shimizu H, Mayer J, Rank CV, Liu Z, Giudice GJ, Tran HH, Marinkovich MP, Brocker EB, Hashimoto T. A novel subepidermal blistering disease with autoantibodies to a 200-kDa antigen of the basement membrane zone. J. Invest. Dermatol. 1996b Jun; 106(6):1333-1338.

Zillikens D, Mascaro JM, Rose PA, Liu Z, Ewing SM, Caux F, Hoffmann RG, Diaz LA, Giudice GJ. A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. J. Invest. Dermatol. 1997a Nov; 109(5):679-683.

Zillikens D, Rose PA, Balding SD, Liu Z, Olague-Marchan M, Diaz LA, Giudice GJ. Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. J. Invest. Dermatol. 1997b Okt; 109(4):573-579.

Zillikens D. Acquired skin disease of hemidesmosomes. J. Dermatol. Sci. 1999 Jun; 20(2):134-154.

Zillikens D, Herzele K, Georgi M, Schmidt E, Chimanovitch I, Schumann H, Mascaro JM Jr, Diaz LA, Bruckner-Tuderman L, Bröcker EB, Giudice GJ. Autoantibodies in a subgroup of patients with linear IgA disease react with the NC16A domain of BP1801. J. Invest. Dermatol. 1999 Dez; 113(6):947–953.

Zillikens D, Giudice GJ. BP180/type XVII collagen: its role in acquired and inherited disorders or the dermal-epidermal junction. Arch. Dermatol. Res. 1999 Apr; 291(4):187-194.

Zillikens D. Blasen bildende Autoimmundermatosen. In: Braun-Falco O, Wolff HH, Plewig G, Landthaler M,Dermatologie und Venerologie. Heidelberg : Springer; 2005 p. 607-638.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammonium Persulfate
Aqua dest.	aqua destillata
BB	Blasenboden
BD	Blasendach
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw	beziehungsweise
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
DE	Dermales Extrakt
DEJ	Dermo-epidermale Junktionszone
DIF	Direkte Immunfluoreszenz
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
ELISA	Enzymed-linked immuno sorbent-assay
FBS	Fetal Bovine Serum
F.I.T.C.	Fluoreszin-Isothiocyanat
GST	Glutathion-S-Transferasen
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HaCaT	Humane Keratinozyten Zell-Linie
HRP	horseradish –Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
IL	Interleukin

IPTG	Isopropyl-ß-$_D$-Thiogalacto-Pyranoside
KCE	Keratinozytenextrakt
LAD-1	Lineare-IgA-Dermatose Antigen 1
M	Molare Masse
MBL	Medical & Biological Laboratories Co
min	Minuten
ml	Milliliter
MMP	Magermilchpulver
NaCl	Natriumchlorid
NHS	normales humanes Serum
OD	Optische Dichte
Pat.	Patient
PBS	Phosphate buffered saline
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PNP	Paraneoplastischer Pemphigus
PK	Positiv-Kontrolle
rpm	Revolutions per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SLE	systemischer Lupus erythematodes
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered Saline
TBST	Tris-buffered Saline Tween-20
TMED	Tetramethylethylendiamine
U	Unit

8.2 Material

➢ Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Name	Hersteller
Abzug captair chem by erlab, Toxicap 1624	Erlab D.F.S S.A.S, Vertretungsbüro Deutschland, Köln
Analysenwaage Analytical Plus	Ohaus Corporation, New Jersey, USA
Begasungsbrutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Biofuge pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Bio Photometer (RS 232C)	Eppendorf AG, Hamburg
Bio Vortex V1	lab4you GmbH, Berlin
Blockthermostat BT 5320	Eppendorf AG, Hamburg
Blotkammer Mini Trans-Blot Cell and Systems	Bio-Rad Laboratories GmbH, München enthält: 4 Gel-Systeme mit 5 Kämmen, 4 Paar Glasplatten + Spacer, 2 Ständer, 4 Glashälterungen, Tank, Deckel, 2 Dichtungen
Blot-Schale	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bunsenbrenner DRUCKGASDOSE 230G	Löt- und Gasgeräte GmbH, Offenau
Cryostat (Leica CM 3050S)	Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Dialyseschlauch	Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Elektrische Feinwaage PT 150	Sartorius AG, Göttingen
Elektrophoresekammer Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
ELISA- Reader (Opsys MR)	Dynex Technologies GmbH, Denkendorf
Eppendorf Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX40)	Olympus Europa Holding GmbH**,** Hamburg
Generator (Olympus U-RFL-T)	Olympus Europa Holding GmbH**,** Hamburg
Gelkassetten	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glasplatten	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kassette	A. Hartenstein GmbH Labor- u. Medizintechnik, Würzburg
Laborabzug captairchem	Erlab Laboreinrichtungen GmbH, Köln
Laborwecker	Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe

Name	Hersteller
Leica CM3050S	Leica Camera AG, Solms
Magnetrührer IKA ® RH basic 2	IKA ® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Magnetrührer	Keison Products, Chelmsford, England
Multipipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
8-fach Pipette (research)	Eppendorf AG, Hamburg
Netzgerät Power Supply EPS 3500	Pharmacia GmbH, Ratingen
Objektträgerkasten	Hassa Laborbedarf, Lübeck
pH-Meter ph526	MultiCal WTW, Weilheim
Pinzette	Roth GmbH +Co KG, Karlsruhe
Pipettierhilfe, pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Power Supply- EPS 3500	GE Healthcare Europe GmbH, München
Rotlicht	Kindermann GmbH, Ochsenfurt
Schüttler Certomat IS	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Schütteltisch Duomax 1030	Heidolph Instruments, Nürnberg
Sonikiergerät (Sonoplus HD 2070)	BANDELIN, electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Spacer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Spannapparatur	Von einem Mitarbeiter selbst gebaut
Sterilbank, Biowizard Kojair	W. H. Mahl, Reinraumtechnik GmbH, Magdeburg
T-75cm²-Zellkulturflasche	Tissue Culture Flask T75, Sarstedt, Nümbrecht
T-175cm²-Zellkulturflasche	Tissue Culture Flask T175, Sarstedt, Nümbrecht
Taumler (Duomax 1030)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Thermostat	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Transferkammer Mini-Protean Tetra Companion Running Module	Bio-Rad Laboratories GmbH, München enthält: Tank, Deckel, Mini Trans-Blot module, Electrode assembly, companion running module
Ultra Low Temperature Freezer -80°C	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, New Brunswick Produkte, Wesseling-Berzdorf
Wanne	Hindrex, Wuppertal

Name	Hersteller
Wasserbad WTH 500	Karl Hecht GmbH & Co., Sondheim
Wasserbad Zellkultur	Lauda Aqualine, Typ AL5, Lauda-Königshofen
Zellschaber	Sarstedt, Newton, N.C., USA
Zentrifuge, Varifuge 3.0 R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge Avanti TM J-25 Centrifuge	Beckman Coulter, Made in U.S.A.
Zentrifuge, Megafuge 1.0	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
5100 Cryo 1°C Freezing Container (Einfrierhilfe)	Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Zellschaber	Hartenstein GmbH, Würzburg

- **Chemikalien**

Name	Hersteller
Aqua dest.	Apotheke UKSH, Campus Lübeck
Acrylamid 4K-Lösung (30%)-Mix 49:1	Appli Chem GmbH, Darmstadt
4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ammoniumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Ammonium Persulfate (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ammoniumsulfat ($(NH_4)_2\ SO_4$)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Aqua dest.	Apotheke UKSH, Campus Lübeck
Bromphenol (Bromphenolbau)	Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Diaminobenzidin-Puffertabletten (DAB)	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck KGaA, Darmstadt
ECL-Plus (Westernblotting Detektion System)	Healthcare, Buchinghamshire, England
Entwickler	AG FA-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Essigsäure	Roth GmbH +Co KG, Karlsruhe
Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Roth GmbH +Co KG, Karlsruhe

Name	Hersteller
Ethanol 70 %	Apotheke UKSH, Campus Lübeck
Fast green	Merck KGaA, Darmstadt
Fixierer	AG FA-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
Glycin	Roth GmbH +Co KG, Karlsruhe
Harnstoff	Roth GmbH +Co KG, Karlsruhe
Isopropyl-ß-$_D$-Thiogalacto-Pyranoside (1M IPTG)	Roth GmbH +Co KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid (K^+Cl^-)	Merck KGaA, Darmstadt
L-Glutathione reduced	Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim
Magermilchpuler (MMP):	Merck KGaA, Darmstadt
ß-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Roth GmbH +Co KG, Karlsruhe
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)-Plätzchen	Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF 100mM)	Appli Chem GmbH, Darmstadt
Phosphorsäure 85%	Merck KGaA, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt
Tetramethylethylendiamine (TEMED)	Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Tris Base	Merck KGaA, Darmstadt
Tris-HCL	Merck KGaA, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Triton X 100	Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim
Trypsin-EDTA	CCP-GmbH, Oberdorla
Tween 20	Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Merck KGaA, Darmstadt

- **Verbrauchsmaterialien**

Name	Hersteller
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare Europe GmbH, München
Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units, Ultracel-10k	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts
Cryo-Röhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark

Name	Hersteller
Dako Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Dialyseschlauch	Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Einmal-Skalpell	Feather Safety Razor Co., LTD, Osaka, Japan
Eis	Apotheke UKSH, Campus Lübeck
Falcon-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Filter	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel
Filter	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
Filterpapier Chromatographierpapier	Hartenstein GmbH, Würzburg
Gelloader-Spitzen (1-200 µl)	A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg
Glutathione-Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glutathione-Matrix	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Handschuhe	Peha-soft, Heidenheim
Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman GmbH, Dassel
Objektträger (superfrost plus)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Proteinmarker BenchMark ™	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Reaktionsgefäße	Fa. Sarstedt, Newton, NC, USA
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten 10 ml, 25 ml	Sarstedt AG & Co. Nümbrecht
Skalpellklingen	Geb. Martin, Tullingen
Vitamin C (L-Ascorbinsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wells	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zentrifugengefäße	Nalgene Rochester, New York, USA

- **Sonstiges**

Name	Hersteller
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
α-6 Anti-CD49f Mouse	Calbiochem, Canada
Bench Mark TM Protein Ladder	Invitrogen GmbH, Technologiepark, Karlsruhe

Name	Hersteller
Carbenicillin	Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R-250	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Complete mini	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Desmoplakin 1 & 2 Mouse monoclonal IgG_{2b}	ProGen Biotechnik GmbH, Heidelberg
ELISA-Kit (EU) Euroimmun BP 180-NC16A-4X-ELISA (IgG)	Euroimmun, Lübeck
ELISA-Kit (EU) Euroimmun BP 230-CF-ELISA (IgG)	Euroimmun, Lübeck
ELISA-Kit- MBL Mesacup BP 180 Test	Medical & Biological Laboratories Co, Nagoya, Japan
ELISA-Kit- MBL Mesacup BP 230 Test	Medical & Biological Laboratories Co, Nagoya, Japan
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
F.I.T.C. conjugate IgA	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
F.I.T.C. conjugate IgG	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glutathion-S-Transferasen (GST)	Interne Bezeichnung C10
GST-NC16A	Interne Bezeichnung C1-5
HaCaT-Zellen	Prof. N. E. Fusenig, DKFZ, Heidelberg
Integrin β-4 (A9) mouse monoclonal IgG_{2a}	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Laminin α-3 (H-187) rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Laminin β-3 (H-300) rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Laminin ϫ -2 (E6) mouse monoclonal IgG_1	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
LB-Medium (Large Capsules)	MP Biomedicals Europe, Ilkirch, Frankreich
Mouse Anti-Human IgG_4	Dako, Glostrup, Dänemark
Mouse Anti-Human IgG_4 (Clone HP 6025)	Southern Biotech, Birmingham, USA
Polyclonal Rabbit Anti-Human (HRP) ➔ IgG, IgA	Dako, Glostrup, Dänemark
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulins (HRP)	Dako, Glostrup, Dänemark

Name	Hersteller
Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunglobulins (HRP)	Dako, Glostrup, Dänemark
Zellkulturmedium: KGM+ (Keratinocyte Growth Medium 2 + Supplement) KGM Bullet Kit	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien

8.3 Tabelle mit allen Ergebnissen

	IIF -> Sp		ELISA					KCE	LAD-1		DE -> IgG_4		ECM	
Pat	**IgG**	**IgA**	**BP 180 EU**	**BP 180 MBL**	**BP 230 EU**	**BP 230 MBL**	**NC 16A**	**IgG 180**	**IgG**	**IgA**	**P200**	**EBA**	**IgG_4**	**Zusatz**
1	neg	neg	16,0	2,7	3,5	0,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
2	neg	neg	3,8	8,9	17,8	3,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
3	neg	neg	<1	1,8	<1	0,7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
4	neg	neg	<1	1,1	4,8	0,7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
5	neg	neg	<1	1,5	<1	0,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
6	neg	neg	5,8	1,6	6,6	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
7	neg	neg	<1	0,8	2,6	0,7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
8	neg	neg	<1	1,9	4,3	4,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
9	neg	neg	4,3	1,3	2,7	0,7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
10	neg	neg	10,3	0,6	15,7	1,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
11	**BD pos**	neg	13,4	1,6	13,2	2,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	**DIF neg**
12	neg	neg	<1	1,9	5,3	1,6	neg	neg	neg	**pos**	neg	neg	neg	
13	neg	neg	<1	0,7	<1	1,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
14	neg	neg	<1	1,3	12,2	1,0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
15	neg	neg	<1	0,8	<1	3,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
16	neg	neg	<1	3,4	<1	1,7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
17	neg	neg	<1	1,2	<1	1,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
18	neg	neg	8,7	0,5	4,9	2,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
19	neg	neg	<1	0,7	<1	0,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
20	neg	neg	11,0	2,8	5,7	1,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
21	neg	neg	<1	0,5	<1	0,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
22	neg	neg	<1	2,0	2,5	1,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
23	neg	neg	19,2	0,7	<1	1,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
24	neg	neg	**30,2**	0,7	11,4	0,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	**DIF neg**
25	neg	neg	<1	0,6	4,1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	

	IIF -> Sp		ELISA					KCE	LAD-1		DE -> IgG_4		ECM	
Pat	**IgG**	**IgA**	**BP 180 EU**	**BP 180 MBL**	**BP 230 EU**	**BP 230 MBL**	**NC 16A**	**IgG 180**	**IgG**	**IgA**	**P200**	**EBA**	**IgG_4**	**Zusatz**
26	neg	neg	<1	2,3	<1	2,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
27	neg	neg	<1	1,2	3,8	1,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
28	neg	neg	**40,3**	2,3	8,3	2,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	**DIF neg**
29	neg	neg	<1	0,5	3,6	3,0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
30	neg	neg	<1	2,4	2,9	**10,6**	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	**DIF neg**
31	neg	neg	<1	0,2	<1	1,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
32	neg	neg	<1	7,8	7,1	1,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
33	neg	neg	<1	3,2	14,5	4,0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
34	neg	neg	<1	0,8	<1	2,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
35	neg	neg	<1	4,9	<1	0,7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
36	neg	neg	<1	0,4	<1	0,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
37	neg	neg	<1	3,9	<1	3,0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
38	neg	neg	<1	1,0	3,8	1,2	neg	neg	neg	**pos**	neg	neg	neg	
39	neg	neg	<1	1,0	<1	1,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
40	neg	neg	<1	1,1	<1	1,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
41	neg	neg	<1	1,2	2,9	1,0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
42	neg	neg	<1	2,3	<1	0,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
43	neg	neg	<1	1,7	<1	1,0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
44	neg	neg	<1	0,9	<1	1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
45	neg	neg	<1	1,4	<1	1	neg	neg	neg	**pos**	neg	neg	neg	
46	neg	neg	<1	2,2	3,7	1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
47	neg	neg	<1	3	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
48	neg	neg	<1	0,7	7,2	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	^	
49	neg	neg	<1	1,2	7,5	1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
50	neg	neg	<1	**48,2**	<1	2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	**DIF neg**
51	neg	neg	<1	1,0	<1	1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
52	neg	neg	<1	4,0	<1	1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
53	neg	neg	<1	2	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
54	neg	neg	**30,3**	**9**	16,5	4	neg	neg	neg	*	neg	neg	neg	0
55	neg	neg	<1	4,0	<1	1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
56	neg	neg	<1	3,2	7,5	<1	*	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
57	neg	neg	<1	**20,0**	16,2	3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0
58	neg	neg	<1	1,2	<1	2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
59	neg	neg	<1	**12,1**	3,6	5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0
60	neg	neg	<1	1,4	2,5	**17**	#	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0
61	neg	neg	3,2	1,4	12,7	1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
62	neg	neg	<1	2,2	<1	1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	

	IIF -> Sp		ELISA					KCE	LAD-1		DE -> IgG_4		ECM	
Pat	**IgG**	**IgA**	**BP 180 EU**	**BP 180 MBL**	**BP 230 EU**	**BP 230 MBL**	**NC 16A**	**IgG 180**	**IgG**	**IgA**	**P200**	**EBA**	**IgG_4**	**Zusatz**
63	**BD pos**	neg	**67,0**	**27,8**	**119,0**	**51**	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0
64	neg	neg	7,4	2,3	5,4	3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
65	neg	neg	11,9	0,7	7,2	1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
66	neg	neg	**148,7**	**10**	10,6	3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	**DIF neg**
67	neg	neg	3,0	1	11,0	2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
68	neg	neg	<1	1	<1	1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
69	neg	neg	3,8	2	4,2	1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
70	neg	neg	13,3	2	3,2	2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
71	neg	neg	2,7	1	<1	2	#	neg	**pos**	neg	neg	neg	neg	
72	neg	neg	2,6	2	3,3	3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
73	neg	neg	4,7	2	<1	1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
74	neg	neg	7,4	1	3,6	1	neg	neg	**pos**	neg	neg	neg	neg	
75	neg	neg	12,7	3	19,8	4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
76	neg	neg	<1	2	<1	1	neg	neg	neg	**pos**	neg	neg	neg	
77	neg	neg	3,8	1	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	**pos**	
78	neg	neg	<1	2	2,2	1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
Σ	**2**	**0**	**5**	**6**	**1**	**3**	**0**	**0**	**2**	**4**	**0**	**0**	**1**	

Pat: Patientenidentifikationsnummer, IIF: indirekte Immunfluoreszenz, Sp: Humane Spalthaut, EU: Euroimmun, MBL: Medical & Biological Laboratories, KCE: Keratinozytenextrakt, LAD-1: Lineare-IgA-Dermatose Antigen 1, DE: dermales Extrakt, p200: p200-Antigen, EBA: Epidermolysis bullosa acquisita, ECM: extrazelluläre Matrix, neg: negatives Ergebnis, pos: positives Ergebnis, DIF: direkte Immunfluoreszenz, neg: negatives Ergebnis, ^: unspezifische Banden, *: kein Probenmaterial, 0: DIF konnte wegen fehlender Kooperativität nicht bestimmt werden, #: nicht auswertbar, da die Anti-GST-Reaktivität nicht vollständig blockiert werden konnte, Σ: Summe der positiven Ergebnisse
Links stehen in grau unterlegt die Patientennummern und oben das jeweilige Testverfahren.

8.5 Publikation

Van Beek N, Dohse A*, **Riechert F***, Krull V, Recke A, Zillikens D, Schmidt E.
Serum autoantibodies against the dermal-epidermal junction in patients with chronic pruritic disorders, elderly individuals, and blood donors prospectively recruited.
Br. J. Dermatol. 2014, Apr
* gleichwertiger Beitrag

Die zu dem Zeitpunkt erhobenen Daten wurden am 9. Juni 2010 bei der Veranstaltung „Uni im Dialog“ in Form eines Posters präsentiert.

8.6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. E. Schmidt für die Überlassung des Themas, die zahlreiche Ratschläge, Anregungen und seine Unterstützung bei der Verwirklichung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. D. Zillikens, Direktor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck, möchte ich für die Bereitstellung der Laboratorien und Materialien zur Durchführung der Experimente danken.

Herrn Dr. med. A. Recke danke ich dafür, dass er mein Interesse für die multiprofessionelle Arbeit im dermatologischen Labor weckte, die zahlreichen Hilfestellungen bei allen auftretenden Problemen, seine Geduld und seine stets verständnisvollen, motivierenden Worte.

Allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe „Bullöse Dermatosen“ möchte ich recht herzlich für die gute Zusammenarbeit und die entspannte Atmosphäre im Labor danken. Wobei ich für die Geduld, das Verständnis und die unermüdliche Hilfsbereitschaft bei meiner Einarbeitung und weiteren persönlichen Betreuung insbesondere Frau M. Freitag und Frau V. Krull zu großem Dank verpflichtet bin.

Überdies bin ich Frau Dr. med. D. Henkel sehr dankbar, dass sie mir mit gescheiten Fragen und Anregungen den Weg zum Erfolg ebnete.

Meinen Eltern danke ich von Herzen für den liebevollen Rückhalt und die jahrelange Unterstützung, ohne die mir das Studium nicht möglich gewesen wäre. Sie haben es mir ermöglicht diese Arbeit fertigzustellen.

Lebenslauf

Name:	Frauke Riechert
Geburtsdatum:	6. Oktober 1981 in Münster (Westfalen)
Eltern:	Prof. Dr.-Ing. Horst Riechert
	Dr. med. Monika Riechert-Zoschenz
Geschwister:	Claas und Ole Riechert
Familienstand:	ledig

Ausbildung:

1988-1991	Harkort Grundschule, Dortmund
1991-1992	Kirchhörder Grundschule, Dortmund
1991-2001	Stadtgymnasium Dortmund
	Abschluss: *Allgemeine Hochschulreife*
2001-2004	Kranken- und Kinderkrankenschule der St. Elisabeth-Stiftung, Bochum
	Abschluss: *staatlich anerkannte Gesundheits- und Kinderkrankenpflegerin*

Beruflicher Werdegang:

2004-2005	Tätigkeit als Krankenschwester auf der operativen Intensivstation im St. Josef-Hospital, Klinikum der Ruhr-Universität Bochum
Januar-Juni 2013	Tätigkeit als chirurgische Weiterbildungsassistenzärztin im Katharinen-Hospital in Unna
Seit August 2013	Tätigkeit als chirurgische Weiterbildungsassistenzärztin in den Sana Kliniken Ostholstein in Oldenburg

Hochschulbildung:

2005-2012	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2008	*Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*
August 2009	Beginn des praktischen Teils der Dissertation
2012	*Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*
2012	*Approbation*

Klinische Ausbildung:

2011-2012	Praktisches Jahr	
	Anästhesie	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
	Innere Medizin	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
	Chirurgie	Berufsgenossenschaftliches Universitäts-klinikum Bergmannsheil, Bochum

Lübeck, den

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst wurde. Alle benutzten Quellen (wörtlich oder sinngemäß) sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht worden.

_____

Lübeck, den