

Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und
Venerologie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. D. Zillikens

Pathogenität von IgA-Autoantikörpern gegen Typ VII Kollagen

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

– Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von
Luisa Maria Trog
aus Magdeburg

Lübeck 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ralf Ludwig
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Holger Hennig

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2014

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 24.09.2014

Promotionskommission der Sektion Medizin

Meinem Großvater Dr. Friedrich Kampe

Bei Tage ist es kinderleicht, die Dinge nüchtern und unsentimental zu sehen. Nachts ist das eine ganz andere Geschichte.

Ernest Hemingway

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Immunsystem	1
1.1.1 Antikörper	2
1.1.2 IgA-Antikörper	5
1.2 Blasenbildende Autoimmundermatosen	5
1.2.1 Diagnostik	6
1.2.2 Pemphigus-Gruppe	9
1.2.3 Pemphigoid-Gruppe	10
1.2.4 Epidermolysis bullosa acquisita	10
1.2.5 IgA-abhängige Dermatosen	11
1.3 Fragestellung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Voten der Ethikkommission	19
2.2 Rekombinante IgA-Autoantikörper	19
2.3 Patientenseren und Spenderseren	19
2.4 Charakterisierung rekombinanter Autoantikörper	20
2.4.1 Herstellung von Gefrierschnitten humaner neonataler Vorhaut . . .	20
2.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz	21
2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	21
2.4.4 Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung der SDS-Gele	22
2.4.5 Westernblot	23

2.5	Indirekter Komplementbindungstest	23
2.6	ROS-Release von neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit immobilisierten Autoimmunkomplexen	24
2.7	Gefrierschnittmodell	27
3	Ergebnisse	32
3.1	Charakterisierung der rekombinanten Autoantikörper	32
3.1.1	Korrektes Molekulargewicht der rekombinanten Autoantikörper	33
3.1.2	Bindungsfähigkeit der rekombinanten Autoantikörper	33
3.2	Fähigkeit rekombinanter IgA-Autoantikörper, Komplement zu aktivieren	34
3.3	Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale durch neutrophile Granulozyten nach Stimulation mit immobilisierten IgA-Immunkomplexen	37
3.4	Induktion einer dermo-epidermalen Separation mit Seren von EBA-Patienten mit IgA-Reaktivität gegen humanes Kollagen Typ VII im <i>ex vivo</i> Modell blasenbildender Dermatosen	39
3.5	Bestimmung der optimalen Konzentrationen der rekombinanten Autoantikörper mittels indirekter Immunfluoreszenz vor Einsatz im Gefrierschnittmodell	40
3.6	Induktion einer dermo-epidermalen Separation durch rekombinante IgA-Autoantikörper im <i>ex vivo</i> Modell blasenbildender Dermatosen	42
4	Diskussion	45
4.1	Krankheitsrelevanz der Autoantikörper subepidermal blasenbildender Autoimmundermatosen	46
4.2	Pathogenität von IgG-Autoantikörpern gegen Typ VII und Typ XVII Kollagen	47
4.3	Pathogenität von IgA-Autoantikörpern	49
4.4	Pathogenetische Wirkung rekombinanter IgA-Autoantikörper gegen Typ VII Kollagen	51
4.5	Verändertes Pathogenesemodell der Epidermolysis bullosa acquisita	61
4.6	Klinische Relevanz und Ausblick	62
5	Zusammenfassung	63

6	Literaturverzeichnis	65
7	Anhang	80
7.1	Verwendete Materialien	80
7.2	Verwendete Laborgeräte	84
8	Publikation	86

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
AIL	<i>Advanced intercross line</i> (Auszuchtmauslinie)
AK	Antikörper
AKT	Protein Kinase B
AUC	<i>Area under curve</i> (Fläche unter der Kurve)
BP	bullöses Pemphigoid
BP180	180 kDa schweres bullöses Pemphigoid Antigen (Typ XVII Kollagen)
BP230	230 kDa schweres bullöses Pemphigoid Antigen
BSA	Bovines Serumalbumin
BSLE	bullöser systemischer Lupus erythematodes
CL-Medium	Chemilumineszenz-Medium
CMP	<i>Cartilage Matrix Protein</i>
COL7	humanes Kollagen VII
CXCL	<i>Chemokin (C-X-C motif) Ligand</i>
DEJ	Dermo-epidermale Junctionszone
DES	dermo-epidermale Spaltbildung
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
Dsg1 und Dsg 3	Desmoglein 1 und 3
D-PBS	<i>Dulbecco's Phosphate buffered saline</i>
EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (Enzymatischer Immunttest)
ERK	extrazellulär-regulierte Kinase

Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
Fc	<i>Fragment crystallisable</i>
FC α RI	FC γ Rezeptor I
FC γ RI - IV	FC α Rezeptor I - IV
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FMLP	<i>Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine</i>
Gr-1	<i>anti-granulocyte receptor-1</i>
hCOL7EF	rekombinantes humanes Kollagen VII-Antigen
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
IC	Immunkomplex
Ig	Immunglobulin
II	Interleukin
IsolgA1	Isotypkontrolle IgA1
IsolgA2	Isotypkontrolle IgA2
JT-Test	Jonckheere-Terpstra-Test
kDa	<i>Kilo Dalton</i>
LAD / Lineare IgA-Dermatose LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	p38-mitogen-aktivierte Kinase
NC1	nicht-kollagene Domäne des Typ VII Kollagen
NC16A	sechzehnte nicht-kollagene Domäne des BP180
NHS	normales humanes Serum
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate buffered saline-Tween</i>
PI3K	<i>Phosphoinositid-3-Kinaseβ</i>
PF	<i>Pemphigus foliaceus</i>
PV	<i>Pemphigus vulgaris</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (reaktive Sauerstoffradikale)
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RU	Relative Lichteinheiten
s.c.	subcutan

SDS-PAGE

*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel
electrophoresis*

SYK

Spleen-Tyrosine-Kinase

Th

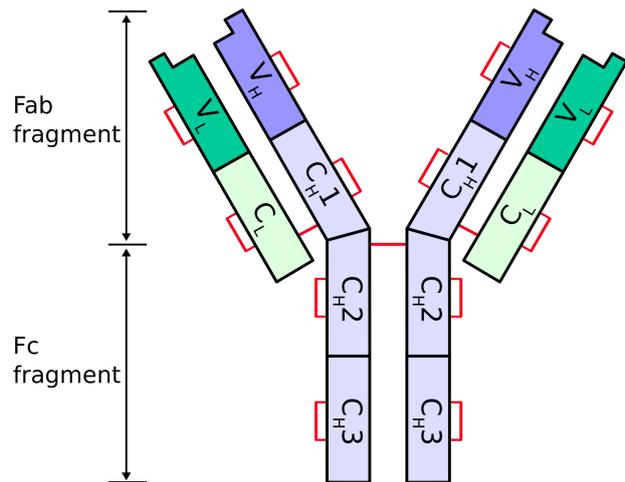
T helper cell (T-Helferzellen)

1 Einleitung

1.1 Immunsystem

Der menschliche Körper ist während seines Lebens unterschiedlichen äußeren Einflüssen ausgesetzt. Zur Anpassung an die Umwelt und zur Abwehr schädigender Einwirkungen haben sich im Laufe der Evolution verschiedene Systeme entwickelt. Das Immunsystem ist eines davon. Dieses schützt den menschlichen Organismus vor körperfremden Molekülen und Organismen. Es setzt sich aus zwei Teilen zusammen, dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Die unspezifische Immunantwort beginnt in der Frühphase eines Infektes und umfasst die Kontrolle von Fremdstoffen (Pathogenen), die eine bekannte Molekülstruktur aufweisen oder die Interferon-Produktion induzieren, und andere unspezifische Abwehrmechanismen. Dabei schützt sie mittels zellulären phagozytierenden Elementen und durch Aktivierung des Komplementsystems auf dem alternativen Weg. Die unspezifische Immunität ist notwendig, um eine Ausbreitung von Pathogenen im Körper zu verhindern. Sie besitzt jedoch nicht die Fähigkeit zur langanhaltenden Erinnerung und Wiedererkennung eines Pathogens, was besonders wichtig für die Adaptation des Immunsystems wäre. Die spezifische Immunantwort wird durch das adaptive Immunsystem vermittelt. Wichtig sind hierbei die B- und T-Lymphozyten, die durch den Kontakt mit Antigenen aktiviert werden. Die T-Lymphozyten haben dabei die Funktion, fremde Erreger zu attackieren und zu lysieren. Die B-Lymphozyten dagegen produzieren und sezernieren spezifische Immunglobuline. Die Immunglobuline, auch Antikörper genannt, treten in spezifische Wechselwirkungen mit den Antigenen und binden diese. Diese Bindung der Antigene an die Antikörper löst eine Signalkaskade aus, welche die Eliminierung der Antigene zum Ziel hat. Dabei stehen verschiedene Wege wie die Phagozytose oder die Lyse durch Aktivierung des Komplementsystems auf dem klassischen Weg zur Verfügung. (Janeway, 2005)

ABBILDUNG 1.1 – Aufbau eines menschlichen IgG-Antikörpers. Zwei schwere (H) und zwei leichte (L) Ketten setzen sich zu einem Heterotetramer zusammen, welches durch inter- und intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert wird (rote Klammern). Die Bindungsstelle für das Antigen (**Fab**-Fragment) wird durch die variablen Domänen gebildet (V), welche mit konstanten Domänen (C) verbunden sind. Die konstanten Domänen bilden den **Fc**-Anteil, welcher sich bei den verschiedenen Antikörpertypen im Hinblick auf Struktur und Funktion unterscheidet. (Bildquelle: (Wikimedia, 2013))



1.1.1 Antikörper

Antikörper (AK) oder Immunglobuline (Ig) sind Glykoproteine, die von B-Zellen (Plasmazellen) synthetisiert und sezerniert werden. Sie haben zwei separate Aufgaben: (1) die spezifische Bindung an pathogene Moleküle, die eine Immunantwort hervorrufen und (2) die Rekrutierung anderer Zellen und Moleküle, um das gebundene Pathogen zu zerstören. Dabei reagieren sie mit Antigenen wie z.B. Pathogenen von Bakterien oder deren toxischen Produkten.

Der Aufbau eines Antikörpers ist charakteristisch: Er ist ein symmetrisches Protein, welches aus vier Ketten aufgebaut ist. Diese setzen sich aus je zwei identischen schweren (*heavy*/H) und leichten (*light*/L) Ketten zusammen. Die Ketten werden sowohl durch Disulfidbrücken als auch durch nichtkovalente Bindungen verknüpft. Dadurch entsteht eine stabile Y-förmige Struktur (Abb. 1.1). (Janeway, 2005)

Der Aufbau der schweren und leichten Ketten variiert. Er lässt sich weiter in einen variablen und einen konstanten Anteil unterteilen. Dabei ist der variable Anteil für die Antigenbindung verantwortlich und der konstante Anteil für die Interaktion mit Antikörper-Rezeptoren und somit für die Interaktion mit z.B. phagozytierenden Zellen.

Die Antikörper lassen sich mit der Protease Papain in drei Fragmente spalten: zwei Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment. Die beiden Fab-Fragmente beherbergen den antigenbindenden Anteil. Sie setzen sich zusammen aus den beiden L-Ketten und einem Teil der H-Ketten. Der restliche Teil der beiden H-Ketten bildet das Fc-Fragment. Dieses beinhaltet bei Immunglobulin G einen Großteil der Glykosylierung des Antikörpers, welcher die Funktionalität des Fc-Fragmentes entscheidend mit beeinflusst. Der Fc-Anteil

ist elementar wichtig für die Interaktion der Antikörper mit den zellulären Bestandteilen des Immunsystems und mit dem Komplementsystem (van de Winkel & Capel, 1993).

Die Vielgestaltigkeit der Antikörper wird durch verschiedene Charakterisierungsmöglichkeiten abgebildet (Elgert, 2009):

Idiotypen Durch die Variabilität der Antikörper kann eine nahezu unbegrenzte Anzahl von verschiedenen Antigenen erkannt und gebunden werden. Diese Variabilität wird durch die sogenannten variablen Domänen bestimmt, welche durch genomische Rekombination und Hypermutation in ihren Bindungseigenschaften biologisch optimiert werden. Verschiedene Idiotypen von Antikörpern unterscheiden sich in den variablen Domänen.

Isotypen Die Variabilität der konstanten Domänen von Antikörpern innerhalb eines Organismus wird durch den Begriff der Isotypen beschrieben. Die Einteilung in fünf verschiedene Isotypen erfolgt anhand gewisser biochemischer Eigenschaften. Die fünf Isotypen der Immunglobuline des Menschen sind IgG, IgA, IgM, IgE und IgD. Daneben gibt es zwei weitere Immunglobuline, IgY bei Vögeln (im Hühnereigelb) und IgW in Knorpelfischen. Die Einteilung in fünf Isotypen ist unvollständig, so dass für IgG vier sogenannte Subklassen (IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4) und für IgA zwei (IgA1 und IgA2) unterschieden werden. Die verschiedenen Isotypen und Subklassen werden durch separate Gene codiert (in der Reihenfolge der Genloci): C_μ für IgM, C_δ für IgD, C_{γ_3} für IgG3, C_{γ_1} für IgG1, ΨC_ϵ für ein nicht exprimiertes Pseudogen von IgE, C_{α_1} für IgA1, C_{γ_2} für IgG2, C_{γ_4} für IgG4, C_ϵ für IgE, C_{α_2} für IgA2.

Für die Leichtketten werden zwei Isotypen unterschieden: κ und λ .

Allotypen Die Gene, die für die konstanten Domänen codieren, zeigen interindividuelle Variationen, welche als Allotypen beschrieben werden. Allotypen werden anhand von immunologischen und genomischen Eigenschaften unterschieden. Die immunologische Einteilung ergibt sich aufgrund von Unterschieden in der Reaktivität mit monoklonalen Antikörpern gegen menschliche Immunglobuline.

Funktion der verschiedenen Antikörper-Isotypen

Der Fc-Anteil bestimmt das Muster, nach welchem die Antikörper an zellständige oder humorale Rezeptoren binden und dadurch diverse sekundäre Effekte bewirken (van de Winkel & Capel, 1993).

Immunglobulin G (IgG) Dieser Isotyp kommt im menschlichen Körper am häufigsten vor und zwar im Plasma und auch in der Kolostralmilch. Die Aufgaben des IgG sind von Bakterien gebildete Toxine oder Mikroorganismen zu binden, damit diese besser durch das Komplementsystem eliminiert werden können. IgG ist plazentagängig und bewirkt damit einen sogenannten Nestschutz für den Fetus. Immunglobulin G bildet vier verschiedene Subklassen: IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4

Immunglobulin A (IgA) Dieser Isotyp kommt vorwiegend an den Schleimhautoberflächen, im Speichel, in Flüssigkeiten und in den Sekreten vor. IgA liegt häufig in Form von Dimeren vor, welche mit einem Joining Protein (J Kette) verbunden sind. Es sind aber auch polymere Formen von IgA bekannt. Sie schützen die Schleimhautoberfläche des Organismus vor bakteriellen Infektionen. Immunglobulin A liegt in zwei verschiedenen Subklassen vor: IgA1 und IgA2.

Immunglobulin M (IgM) Dieses liegt als Pentamer vor, welches auch über eine J-Kette verknüpft ist. IgM aktiviert besonders gut das Komplementsystem und wird bei einer Immunantwort als erstes produziert.

Immunglobulin E (IgE) Dieser Isotyp ist bei allergischen Reaktionen von Relevanz. IgE bindet an spezifische Rezeptoren auf den Mastzellen und erwirkt nach Kontakt mit einem Antigen die Freisetzung von Mediatoren wie Histamin aus diesen.

Immunglobulin D (IgD) Die physiologische Funktion von IgD ist bisher noch relativ unklar.

(Janeway, 2005)

1.1.2 IgA-Antikörper

Die primär wichtige Aufgabe des IgA-Antikörpers ist die Abwehrfunktion im Schleimhautbereich. Während IgA in großen Mengen produziert wird – 66 mg/kg/Tag beim Erwachsenen – stellt es nur 20% der Antikörperfraktion im Serum dar. Dies resultiert aus einem schnellen Abbau bei einer kurzen Halbwertszeit im Serum von nur 3 bis 6 Tagen. Beim Menschen sind zwei IgA-Subklassen bekannt, IgA1 und IgA2. Dabei sind für IgA1 ein Allotyp und für IgA2 drei Allotypen bekannt: IgA2 m(1), IgA2 m(2) und IgA2 n. IgA2 ist resistent gegenüber der Spaltung durch bakterielle Enzyme. Beim IgA2 m(1)-Allotyp sind die beiden schweren und leichten Ketten nicht komplett durch H-L Disulfid-Brücken verbunden. Beim Menschen liegt der Großteil der im Serum vorkommenden IgA-Antikörper in monomerer Form vor. Nur eine kleine Fraktion ist mit einer zusätzlichen J-Kette polymerisiert. Dimere IgA-Antikörper, die mit einer J-Kette verbunden sind, werden von polymeren Antikörper-Rezeptoren gebunden und durch epitheliale Zellen an die Schleimhautoberfläche transportiert. Dieses sekretorische IgA dient zur Immunabwehr der Schleimhäute. Nach der Sekretion bleibt eine sekretorische Komponente (SC-Kette) als Fragment des polymeren Antikörper-Rezeptors an den IgA-Antikörpern bestehen. (Kerr, 1990) Derzeit sind fünf Rezeptoren bekannt, die spezifisch IgA-Antikörper binden: der bereits beschriebene polymere Antikörper-Rezeptor, der $Fc\alpha$ Rezeptor I (CD98), der $Fc\alpha/\mu$ Rezeptor, der asialoglycoprotein Rezeptor und der Transferrin Rezeptor (Monteiro & Van De Winkel, 2003). Der $FC\alpha$ Rezeptor I ($FC\alpha$ RI) wird beim Menschen von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie von Monozyten und Macrophagen präsentiert. Bisher wurde kein homologer Rezeptor für Mäuse beschrieben (Decot *et al.* , 2005). Daher muss die Aussagekraft von Maus-Modellen für IgA vermittelte Autoimmunerkrankungen in Frage gestellt werden. Bindet IgA, ohne selbst an ein Antigen gebunden zu haben, an den $FC\alpha$ RI, löst dies ein inhibitorisches Signal aus (Pasquier *et al.* , 2005). Binden monomere oder polymere Antikörper, die selbst ein Antigen gebunden haben, an den Rezeptor, wird eine proinflammatorische Kaskade ausgelöst. Zu dieser gehören die Rekrutierung von Neutrophilen, die Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS-Release) und die Antikörper abhängige Zytotoxizität (Monteiro, 2010).

1.2 Blasenbildende Autoimmundermatosen

Gemeinsames Kennzeichen aller blasenbildenden Autoimmundermatosen ist die Ablagerung von Autoantikörpern in der Epidermis oder der dermo-epidermalen Junctionszo-

ne. Diese Autoantikörper vermitteln direkte pathologische Wirkungen über verschiedene Mechanismen, zum einen Fc-unabhängig durch Bindung der Autoantikörper an ihr Autoantigen oder indirekt über die Fc-abhängige Effektorfunktion der Autoantikörper. (Duvert-Lehembre & Joly, 2013)

Bei vielen der Autoantigene handelt es sich um Strukturproteine der Haut, welche sowohl im Rahmen von Autoimmunerkrankungen als auch im Rahmen von hereditären Dermatosen eine Bedeutung haben (Abb. 1.2). So führt ein Gendefekt im Typ VII Kollagen zur *Epidermolysis bullosa dystrophica*, die Bildung von Autoantikörpern dagegen zur *Epidermolysis bullosa acquisita* (Chen *et al.* , 2012). Diese doppelte Bedeutung spielt eine wesentliche Rolle für das Verständnis und die Erforschung dieser Strukturproteine. Dennoch ist bisher unbekannt, wie es überhaupt zu einem Verlust der Immuntoleranz gegenüber diesen Proteinen kommen kann. Man unterscheidet daher bei den blasenbildenden Autoimmundermatosen vier Hauptgruppen anhand der Zielantigene (Sitaru *et al.* , 2004): die Pemphiguserkrankungen, die Pemphigoiderkrankungen, die *Epidermolysis bullosa acquisita* und die *Dermatitis herpetiformis* Dühring.

Dabei liegt die Blasenbildung bei den Pemphiguserkrankungen intradermal und bei den drei anderen Gruppen subepidermal (Sitaru *et al.* , 2004). Bei der Gruppe der Pemphiguserkrankungen richten sich die Autoantikörper gegen die desmosomalen Proteine, welche elementar für die Zell-Zell-Adhäsion innerhalb der Epidermis sind. Die Bindung von Autoantikörpern an die Desmosomen führt zu einem Verlust des intraepidermalen Zell-Zell-Kontaktes und somit zu der Ausbildung einer schlaffen intraepidermalen Blase (Schmidt *et al.* , 2000b). Dagegen lösen Autoantikörper gegen die Strukturproteine der dermo-epidermalen Junctionszone (DEJ), sogenannte hemidesmosomale Plaques, bei den Pemphigoiderkrankungen und der *Epidermolysis bullosa acquisita* pralle subepidermale Blasen aus (Schmidt & Zillikens, 2013). Beim bullösen Pemphigoid sind die Zielantigene BP180 (Kollagen XVII) (Olaru *et al.* , 2006) und BP230 (Sitaru & Zillikens, 2005), bei der *Epidermolysis bullosa acquisita* ist es das Typ VII Kollagen (Mihai & Sitaru, 2007). Bei der *Dermatitis herpetiformis* Dühring kommt es ebenfalls zu einer subepidermalen Blasenbildung. Sie ist charakterisiert durch granuläre Ablagerungen von IgA in den dermalen Papillenspitzen, als Autoantigen fungiert hier die epidermale Transglutaminase (Sárdy *et al.* , 2002).

1.2.1 Diagnostik

Für die Diagnosestellung sind das klinische Bild, die histologische Untersuchung sowie die direkte und indirekte Immunfluoreszenz von elementarer Bedeutung. Eine ge-

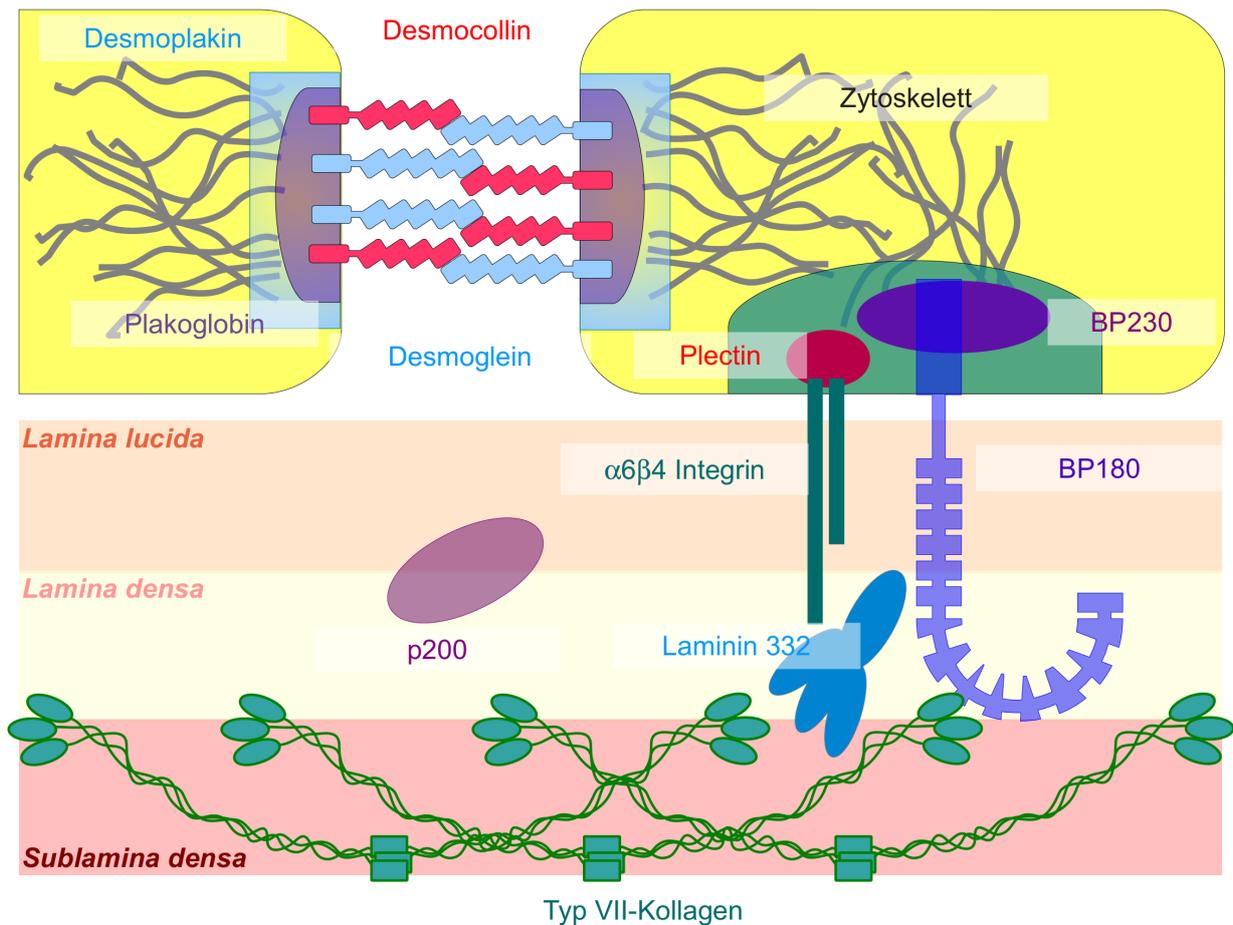


ABBILDUNG 1.2 – Autoantigene blasenbildender Dermatosen in Epidermis und dermo-epidermaler Junctionszone. Autoantikörper bei blasenbildenden Autoimmundermatosen sind im wesentlichen gegen Strukturproteine der Haut gerichtet. Desmosomen werden zwischen den Zellen durch die Verankerung von Desmoglein 1 und 3 sowie Desmocollin 1 und 3 gebildet, welche intrazellulär über Plakoglobin und Desmoplakin mit dem Zytoskelett verbunden sind. Desmoglein 1 und 3 sind die Hauptantigene beim Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus. Hemidesmosomen verankern die Keratinozyten über $\alpha_6\beta_4$ -Integrin und BP180/ Typ XVII Kollagen an der epidermalen Basalmembran. Intrazellulär sind sie mit Plectin und BP230 verbunden, extrazellulär mit Laminin 332. BP180 und BP230 sind Autoantigene des bullösen Pemphigoides und des vernarbenden Pemphigoides. Autoreaktivität mit Laminin 332 bei vernarbendem Pemphigoid gilt als Hinweis auf eine Paraneoplasie. Die Ankerfibrillen der epidermalen Basalmembran werden aus Typ VII Kollagen gebildet, welches das Autoantigen der Epidermolysis bullosa acquisita ist. P200 ist das Autoantigen einer Pemphigoiderkrankung, die pathomorphologisch dem bullösen Pemphigoid gleicht, aber einen etwas mildereren Verlauf haben soll. Es handelt sich dabei mutmaßlich um Laminin γ_1 . Nicht gezeigt ist die epidermale Gewebstransglutaminase, das Autoantigen der Dermatitis herpetiformis Duhring. Nach (Bieber *et al.* , 2010).

naue Charakterisierung der Autoantikörper lässt sich durch weitere immunserologische Untersuchungen mittels Immunoblot und ELISA vornehmen. Durch die histologische Untersuchung lässt sich eine intra- von einer subepidermalen Spaltbildung unterscheiden und somit die Gruppe der Pemphiguserkrankungen von den drei anderen Gruppen

differenzieren. Die Histologie spielt bei der Diagnostik eine ergänzende Rolle. Immunfluoreszenzmikroskopisch lassen sich verschiedene Muster von Autoantikörper- und Komplementfaktorablagerungen in Hautbiopsien nachweisen, die eine grundlegende Unterscheidung zwischen den verschiedenen blasenbildenden Autoimmundermatosen erlauben. Im wesentlichen werden die in Tab. 1.1 beschriebenen Muster unterschieden. Werden in der Haut Autoantikörper nachgewiesen, gilt die Diagnose einer blasenbildenden Autoimmundermatose als gesichert. (Duvert-Lehembre & Joly, 2013; Schmidt & Zillikens, 2013; Sitaru *et al.* , 2004)

Autoantigen	Detektion	Fluoreszenzmuster	Erkrankung
BP180/Typ XVII Kollagen, BP230	IgG	Basalmembran, linear	Bullöses Pemphigoid
BP180/Typ XVII Kollagen, BP230	IgG, C3	Basalmembran, linear	Pemphigoid gestationis
BP180/Typ XVII Kollagen, Laminin 5, $\alpha 6\beta 4$ -Integrin	IgG, IgA, C3	Basalmembran, linear	Schleimhautpemphigoid
LAD-1, BP180/Typ XVII Kollagen	IgA, (C3)	Epidermal	Pemphigus foliaceus
p200	IgG, C3	Epidermal	Anti-p200-Pemphigoid
Typ VII Kollagen	IgG, (IgA), C3	Basalmembran, linear	Epidermolysis bullosa acquisita
Desmoglein 1	IgG und C3	Epidermal interzellulär (basal)	Pemphigus foliaceus
Desmoglein 3 & 1	IgG, C3	Epidermal interzellulär	Pemphigus vulgaris
Plakine, Desmoglein 3, Desmoglein 1	IgG, C3	Epidermal interzellulär	Paraneoplastischer Pemphigus
Desmocollin 1, Desmoglein 1	IgA	Epidermal	IgA-Pemphigus
Epidermale Transglutaminase	IgA	Papillär, granulär	Dermatitis herpetiformis Duhring

TABELLE 1.1 – Immunfluoreszenzmikroskopische Muster verschiedener blasenbildender Autoimmundermatosen, abgeändert nach (Sitaru *et al.* , 2004)

In der indirekten Immunfluoreszenz werden die im Serum zirkulierenden Autoantikörper auf Hautschnitten nachgewiesen (Chhabra *et al.* , 2012; Pohla-Gubo & Hintner, 2011). Immunserologisch lässt sich mittels ELISA- oder Immunoblotuntersuchungen die molekulare Spezifität der Antikörper nachweisen (Mihai & Sitaru, 2007; Tampoia *et al.* ,

2012). Hierzu werden Extrakte von Dermis, Epidermis, kultivierten Keratinozyten oder rekombinante Formen von Zielantigenen verwendet.

1.2.2 Pemphigus-Gruppe

In dieser Gruppe sind die Autoantikörper gegen desmosomale Strukturproteine gerichtet, es resultiert eine intraepidermale Spaltbildung (Schmidt *et al.* , 2000b). Man unterscheidet den Pemphigus vulgaris und foliaceus (Tsuruta & Hashimoto, 2012).

Pemphigus vulgaris

Klinisch zeigen sich schlaffe Blasen, die schnell einreißen und sowohl Erosionen als auch Krusten hinterlassen. Die Umgebungshaut kann gesund erscheinen oder erythematös sein. Die Mundschleimhaut ist bei den meisten Patienten initial betroffen. Die Zielantigene der Autoantikörper sind Desmoglein 3, gelegentlich finden sich auch Antikörper gegen Desmoglein 1 (Abasq *et al.* , 2009). In der indirekten Immunfluoreszenz lassen sich daher epidermal interzelluläre IgG-Ablagerungen nachweisen (Schmidt *et al.* , 2000b).

Pemphigus foliaceus

Auch hier präsentiert sich die Klinik mit schlaffen Blasen, die schnell erodieren und dabei eine blättereartige Schuppung hinterlassen. Die Prädilektionsstellen sind die seborrhoischen Areale vor allem im Gesicht und am Oberkörper. In der Histologie lässt sich eine Spaltbildung im Stratum granulosum nachweisen (Shimizu *et al.* , 1995). Als Zielantigen wirkt hier das Desmoglein 1 (Wheeler *et al.* , 1991). In der direkten Immunfluoreszenz lässt sich der Pemphigus foliaceus (PF) nicht sicher vom Pemphigus vulgaris (PV) unterscheiden. Die Autoantikörper binden beim PV eher in den unteren Epidermisschichten, während sie beim PF mehr in den oberen Schichten binden (Schmidt *et al.* , 2000b).

Pemphigus-Varianten

Eine der Pemphigus-Varianten ist der IgA-Pemphigus, welcher gesondert unter 1.2.5 beschrieben wird. Zusätzlich werden der Pemphigus herpetiformis mit einer ähnlichen Klinik wie bei der Dermatitis herpetiformis Duhring, der Pemphigus erythematosus, mit

ähnlichen Befunden in der Histologie und der Immunfluoreszenz wie beim Lupus erythematodes, der paraneoplastische und der medikamenten-induzierte Pemphigus zu der Pemphigus-Gruppe gezählt. (Venugopal & Murrell, 2012)

1.2.3 Pemphigoid-Gruppe

Hierbei handelt es sich um eine Krankheits-Gruppe, in der sich subepidermale Blasen bilden. Die Autoantikörper sind gegen hemidesmosomale Strukturproteine in der Lamina lucida gerichtet.

Bullöses Pemphigoid

Das bullöse Pemphigoid (BP) betrifft vor allem ältere Menschen (Duvert-Lehembre & Joly, 2013) und ist die häufigste der blasenbildenden Autoimmundermatosen (Di Zenzo *et al.* , 2012). Das klinische Bild umfasst klassischerweise pralle Blasen, vorwiegend in den Intertrigines und an den Innenseiten der Oberschenkel lokalisiert (Hertl & Schuler, 2002; Schmidt *et al.* , 2012). Die Autoantikörper haben als Zielantigen das intra- und extrazellulär liegende BP180 (Giudice *et al.* , 1992) sowie das intrazellulär liegende BP230 (Skaria *et al.* , 2000). Der immundominante Anteil des BP180 ist dabei die sechzehnte nicht-kollagene Domäne (NC16A)(Giudice *et al.* , 1993; Zillikens *et al.* , 1997). In der direkten Immunfluoreszenz lassen sich lineare Ablagerungen von Komplement C3 und IgG an der dermo-epidermalen Junctionszone nachweisen (Schmidt *et al.* , 2012). Die Krankheitsaktivität korreliert mit den Serumspiegeln der Antikörper gegen die NC16A-Domäne des BP180 (Feng *et al.* , 2008).

Pemphigoid-Varianten

Zusätzliche Sonderformen sind das Pemphigoid gestationis, das Schleimhautpemphigoid und die lineare IgA-Dermatose, letztere wird unter 1.2.5 beschrieben.

1.2.4 Epidermolysis bullosa acquisita

Die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) ist eine seltene Erkrankung. Die Inzidenz wird mit 0,17 bis 0,26 Neuerkrankungen pro Jahr pro eine Million Einwohner für Westeuropa angegeben (Bernard *et al.* , 1995; Zillikens *et al.* , 1997). Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr, wobei jedes Lebensalter betroffen sein

kann. Eine ethnische oder Geschlechtsprädisposition besteht nicht (Gammon & Briggaman, 1993; Nanda *et al.* , 2004; Wong & Chua, 2002). Es können drei verschiedene klinische Varianten der EBA unterschieden werden (Buijsrogge *et al.* , 2011; Remington *et al.* , 2008): (1) Die mechanobullöse EBA ist charakterisiert durch pralle Blasen an mechanisch beanspruchten Körperstellen wie den Streckseiten der Gelenke. Nach der Abheilung bleiben Narben und Milien, es können auch eine Nageldystrophie oder Alopezie resultieren. (2) Die generalisiert entzündliche Variante ähnelt sehr dem BP. Hier sind genauso häufig nicht beanspruchte Areale betroffen. (3) Die dritte Variante ist klinisch kaum vom Schleimhautpemphigoid abzugrenzen und entwickelt vorwiegend an den Schleimhäuten Läsionen. Die EBA wird durch Autoantikörper gegen das 290 kDa schwere Typ VII Kollagen hervorgerufen (Ludwig & Zillikens, 2011). Immundominant wirkt dabei die nicht-kollagene Domäne NC1 (Chen *et al.* , 2007). Die Autoantikörper induzieren eine subepidermale Blasenbildung (Hertl & Schuler, 2002) und sind überwiegend vom IgG-Subtyp, seltener auch vom IgA-Subtyp (Vodegel *et al.* , 2002). Die Blasenbildung betrifft auch regelmäßig die Schleimhäute und ist damit häufig verantwortlich für schwere Krankheitsverläufe (Delgado *et al.* , 2011). In der Diagnostik finden sich in der indirekten Immunfluoreszenz bei ca. 50 % der Patienten im Blut zirkulierende IgG- oder IgA-Autoantikörper (Hashimoto *et al.* , 2012). In der direkten Immunfluoreszenz zeigen sich lineare Ablagerungen von IgG, IgA, IgM und Komplement C3 an der dermo-epidermalen Junktionszone (Delgado *et al.* , 2011). Es sind jedoch auch seltene Krankheitsfälle bekannt, in denen sich nur IgA-Ablagerungen finden (Buijsrogge *et al.* , 2011; Vodegel *et al.* , 2002). In der Histologie fallen bei der entzündlichen Variante häufig neutrophile und seltener auch eosinophile Granulozyten auf. Bei der mechanobullösen Variante ist dagegen nur ein geringes Entzündungsinfiltrat nachzuweisen (Buijsrogge *et al.* , 2011). Mittels dermalen Extrakte oder einer rekombinanten Form der NC1-Domäne lässt sich im Immunoblot oder ELISA die Reaktivität gegenüber Typ VII Kollagen bestätigen (Komorowski *et al.* , 2013).

1.2.5 IgA-abhängige Dermatosen

Bei den in diesem Abschnitt beschriebenen Erkrankungen wird vorrangig IgA-Reaktivität gegenüber den Zielantigenen gefunden. Bisher existieren nur indirekte Hinweise, dass diese IgA-Reaktivität eine direkte pathogenetische Bedeutung hat (Zone *et al.* , 2004). Morphologisch fallen gewisse Unterschiede von IgA- zu IgG-vermittelten Autoimmun-dermatosen auf.

Lineare IgA-Dermatose

Diese Erkrankung wurde direkt nach dem immunfluoreszenzoptischen Muster der linearen IgA-Ablagerungen an der dermo-epidermalen Junctionszone benannt. Beim Autoantigen handelt es sich um die abgeschilferte Ektodomäne des Typ XVII Kollagen (BP180), welches auch das Hauptantigen beim bullösen Pemphigoid und beim Pemphigoid gestationis ist. Das 120 kDa schwere Protein wird auch als LAD-1 bezeichnet (Marinkovich *et al.* , 1996; Zane *et al.* , 1990). Klinisch finden sich Erytheme mit randständigen, *juwelenartigen* Blasen am gesamten Integument (Abb. 1.3). Es können jedoch auch lediglich uncharakteristische Erytheme oder urtikarielle Plaques vorliegen. Ein Befall der Schleimhäute mit Erosionen und Ulzerationen ist häufig und betrifft bis zu 70% der Patienten (Wojnarowska *et al.* , 1988). Betroffen sind sowohl Kinder als auch Erwachsene. Die lineare IgA-Dermatose gilt als die häufigste blasenbildende Autoimmundermatose im Kindesalter (Wojnarowska *et al.* , 1988). In der Histologie zeigt sich eine superepidermale Blase mit einem ausgeprägten Neutrophilen-Infiltrat und wenigen Eosinophilen. Des Weiteren stellen sich vereinzelte papilläre Mikroabszesse dar. Bei 60% der Patienten lassen sich zirkulierende IgA-Antikörper mittels Immunoblot mit der löslichen extrazellulären Domäne des BP180 (LAD-1) aus dem Überstand kultivierter Keratinozyten nachweisen (Zillikens *et al.* , 1999).

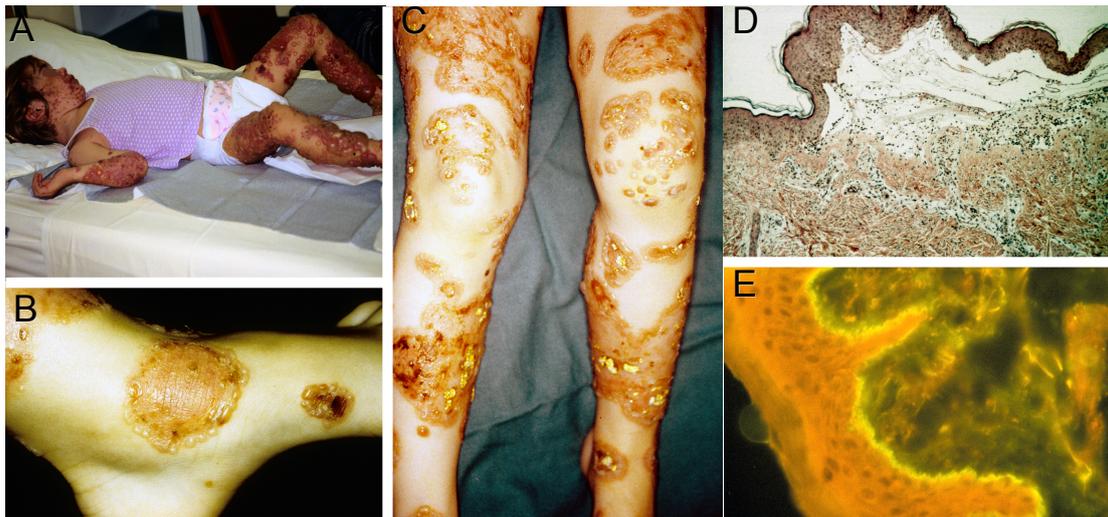


ABBILDUNG 1.3 – Klinische Morphologie der linearen IgA-Dermatose. Bei der linearen IgA-Dermatose findet man klinisch Ekzempläsionen mit randständigen prallen Blasen, wodurch ein *juwelenartiger* Aspekt entsteht (**A,B,C**). Histologisch findet man eine subepidermale Blasenbildung mit Neutrophileninvasion (**D**). In der direkten Immunfluoreszenzmikroskopie zeigt sich eine lineare Ablagerung von IgA-Autoantikörpern entlang der dermo-epidermalen Junctionszone (**E**). Bilder des Diaarchives der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck.

IgA-Pemphigus

Bei dieser Erkrankung wird immunfluoreszenzmikroskopisch eine interzelluläre Ablagerungen von IgA gefunden. Klinisch präsentieren sich schlaffe Blasen, häufig von Pusteln umgeben. In der Histologie findet sich als Korrelat eine starke Infiltration mit neutrophilen Granulozyten und eine intraepidermale Akantholyse. Es werden zwei Krankheitstypen unterschieden. (1) Die intraepidermal-neutrophile IgA-Dermatose zeigt eine suprabasale Akantholyse mit Ablagerungen von IgA innerhalb der gesamten Epidermis. Das Autoantigen ist bisher nicht eindeutig identifiziert. Es wird in Einzelfällen der Nachweis von IgA-Autoantikörpern gegen Desmoglein 1 (Dsg 1) und Desmoglein 3 (Dsg 3) beschrieben (Kopp *et al.* , 2006). (2) Bei der anderen Variante, der subkorneal-pustulösen Dermatose, betreffen sowohl die Akantholyse als auch die IgA-Ablagerungen nur die oberen Schichten der Epidermis. Diese Variante wird auch als IgA-Pemphigus foliaceus bezeichnet. Hier wird als Antigen das Desmocollin 1 beschrieben.(Tsuruta *et al.* , 2011)

IgA-Epidermolysis bullosa acquisita

Hierbei handelt es sich um eine Variante der Epidermolysis bullosa acquisita, bei der vorwiegend Autoantikörper vom IgA-Isotyp gefunden werden. Diese sind ebenso wie bei der IgG-Variante oder den Mischformen der EBA gegen Typ VII Kollagen gerichtet. Klinisch scheint die IgA-Reaktivität vorwiegend mit der inflammatorischen Variante zu korrelieren, während bei IgG-EBA auch die sogenannte mechano-bullöse Form auftritt (Buijsrogge *et al.* , 2011)(Abb. 1.4).



ABBILDUNG 1.4 – Klinische Morphologie der Epidermolysis bullosa acquisita. Das klinische Bild der Epidermolysis bullosa acquisita ist sehr variationsreich. Im wesentlichen treten entzündliche Formen (inflammatorische Variante) mit Blasen, Erosionen und Ekzemen (**A,C**) sowie die mechano-bullöse Form auf, bei der in Hautbereichen mit erhöhter mechanischer Belastung chronische Erosionen und Degenerationen (**B,C**) entstehen. In der indirekten Immunfluoreszenz auf Spalthaut zeigt sich eine lineare Fluoreszenz auf der dermalen Seite der artifiziellen Blase (**E**). Bilder des Diaarchives der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck.

Dermatitis herpetiformis Duhring

Die Dermatitis herpetiformis Duhring ist in Deutschland eine seltene Erkrankung des frühen und mittleren Erwachsenenalters (Abb. 1.5). Sie zeichnet sich durch gerötete häufig exkorierte Papeln oder Vesikel insbesondere an den Extremitäten-Streckseiten aus. Immer ist sie mit einer glutensensitiven Enteropathie (Zöliakie) assoziiert. Die Zöliakie lässt sich durch den Nachweis von IgA-Serumantikörpern gegen Endomysium bestätigen. Bisher ist jedoch nicht geklärt, wie es zur Ablagerung der IgA-Immunkomplexe in der Dermis und zur Blasenbildung kommt (Nakajima, 2012). In der indirekten Immunfluoreszenz finden sich keine Ablagerungen an der Dermis oder Epidermis. Jedoch lassen sich auf Ösophagusschleimhaut-Schnitten von Affen IgA-Antikörper gegen Endomysium nachweisen. In der direkten Immunfluoreszenz beweist eine granuläre Ablagerung von IgA in der papillären Dermis die Diagnose (Alonso-Llamazares *et al.* , 2007). Mittels Histologie lässt sich eine subepidermale Blase mit einem Entzündungsinfiltrat aus neutrophilen und seltener auch eosinophilen Granulozyten darstellen. Im ELISA lässt sich eine Antikörperreaktivität gegen die gewebständige und epidermale Transglutaminase nachweisen (Sárdy *et al.* , 2002).

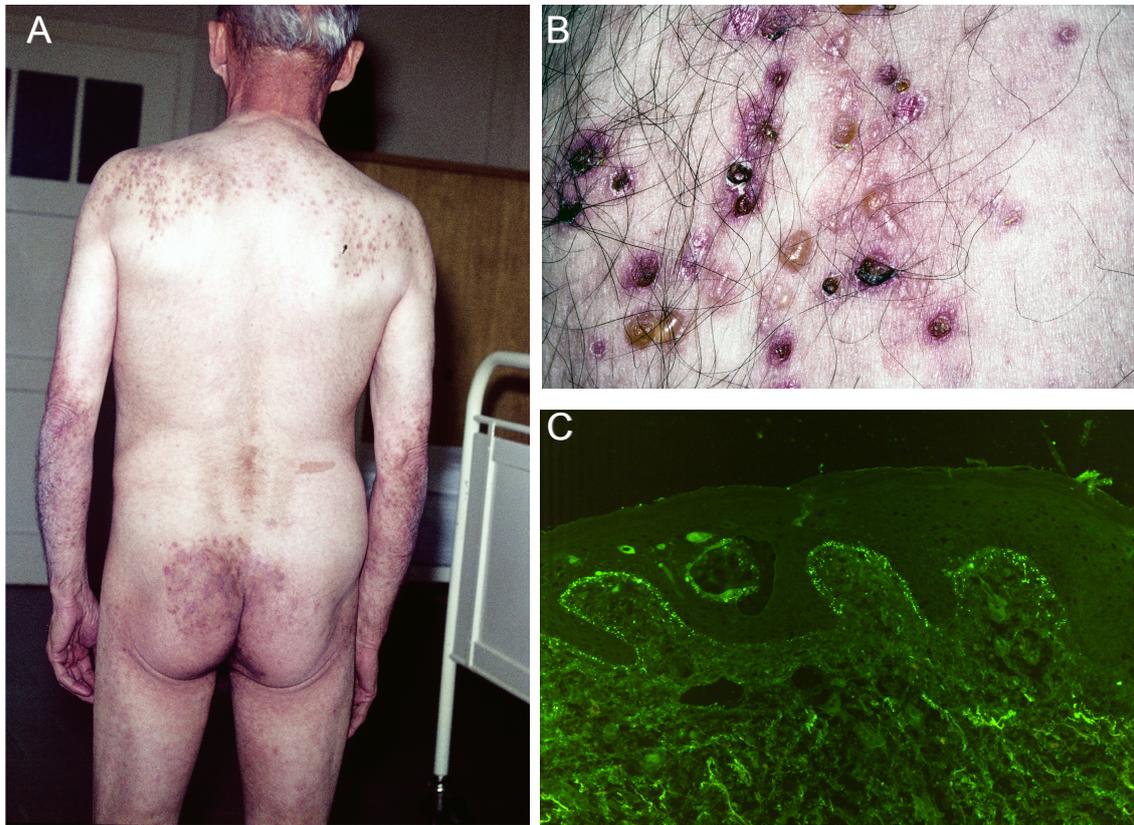


ABBILDUNG 1.5 – Klinische Morphologie des Morbus Duhring. Typisch für die Dermatitis herpetiformis Duhring ist eine Ausbildung von kleinen prallen Blasen insbesondere an Ellenbögen und im Sakralbereich (**A,B**). Dieses Verteilungsmuster und der außergewöhnlich starke Juckreiz sind zusammen mit kleinen Splitterblutungen an den Fingerkuppen nahezu pathognomonisch. In der direkten Immunfluoreszenz, nicht jedoch in der indirekten Immunfluoreszenz findet sich eine granuläre Ablagerung von Immunkomplexen aus IgA und epidermaler Gewebstransglutaminase an der dermo-epidermalen Junctionszone, mit Betonung der Papillen (**C**). Bilder des Diaarchives der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck.

1.3 Fragestellung

Die bisherige Forschung zu blasenbildenden Autoimmundermatosen konzentrierte sich vorrangig auf die Aufklärung der pathogenetischen Bedeutung von Autoantikörpern des IgG-Isotyps. Zur Bedeutung von IgA-Autoantikörpern liegen nur indirekte Hinweise vor, insbesondere durch die inhibitorische Wirkung eines Antikörpers gegen $Fc\alpha$ -Rezeptor I, welche die leukozyten-abhängige dermo-epidermale Separation im Kryoschnittmodell verhindern kann (van der Steen *et al.* , 2012). Aufgrund der Befunde zu IgG-Autoantikörpern liegt es nahe, dass auch IgA-Autoantikörper, welche sich bei verschiedenen blasenbildenden Autoimmundermatosen spezifisch nachweisen lassen, eine pathogenetische Wirkung haben.

Das Ziel meiner Arbeit ist es deshalb, die Pathogenität von IgA-Autoantikörpern gegen Typ VII Kollagen nachzuweisen. Aus diesem Grunde sollte ein rekombinanter Ansatz verfolgt werden, bei dem zunächst murine variable Domänen von Antikörpern gegen humanes Typ VII Kollagen auf konstante humane Domänen des IgA1- und des IgA2-Typs geflanscht werden. Auf diese Weise können IgA-Autoantikörper, die bei der IgA-EBA auftreten, synthetisch in hochreiner und homogener Form nachgestellt werden.

Diese rekombinanten IgA1- und IgA2-Autoantikörper sollen zunächst in den gleichen Routineverfahren untersucht werden, welche auch für die Diagnostik von blasenbildenden Autoimmunerkrankungen Verwendung finden:

1. Indirekte Immunfluoreszenz auf Kryoschnitten menschlicher Haut
2. Immunoblot mit Extrakten der menschlichen Dermis

Zum Nachweis der Pathogenität sollen die rekombinanten Autoantikörper in verschiedenen Krankheitsmodellen untersucht werden, welche auch für IgG-Autoantikörper bereits erfolgreich angewendet wurden.

1. Indirekter Komplementbindungstest auf Kryoschnitten menschlicher Haut
2. *ex-vivo*-Kryoschnittmodell der leukozytenabhängigen dermo-epidermalen Spaltbildung
3. *in-vitro*-Modell zur Antikörper-abhängigen Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies durch neutrophile Granulozyten, mit und ohne Zugabe von Inhibitoren des $Fc\alpha$ -Rezeptor I

In-vivo-Experimenten in Mäusen steht die Tatsache entgegen, dass Mäuse kein Ortholog des menschlichen $Fc\alpha$ -Rezeptor I haben und kein Rezeptor mit analoger Wirkung bekannt ist (Decot *et al.* , 2005; van Egmond *et al.* , 1999).

2 Material und Methoden

Eine Liste der verwendeten Materialien und Laborgeräte befindet sich im Anhang (siehe Kapitel 7). Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders ausgezeichnet, im Reinheitsgrad *pro analysi* verwendet.

2.1 Voten der Ethikkommission

Die durchgeführten Untersuchungen mit Serum, Haut oder Leukozyten sowohl von Spendern als auch von Patienten wurden von der zuständigen Ethikkommission der Universität Lübeck positiv begutachtet (Aktenzeichen Nr. 04-061, 04-144 und 04-143).

2.2 Rekombinante IgA-Autoantikörper

Die rekombinanten Autoantikörper wurden freundlicherweise von Dr. Andreas Recke für die Versuche zur Verfügung gestellt. In der Arbeitsgruppe wurden bereits 2010 rekombinante Autoantikörper der IgG-Klasse gegen humanes COL7 mittels Phage-display generiert (Recke *et al.*, 2010). Diese wurden von Herrn Dr. Recke in die oben beschriebenen IgA-Autoantikörper umkloniert. Die Proben mit den rekombinanten Autoantikörpern wurden für die folgenden Versuche in aufgereinigtem Zustand bereitgestellt.

2.3 Patientenseren und Spenderseren

In dieser Arbeit wurden zusätzlich zu den oben genannten rekombinanten Antikörpern auch Patientenseren verwendet. Hierbei wurden sowohl Seren von IgA-EBA (siehe 1.2.5) und IgG-EBA als auch das Serum eines BP-Patienten genutzt. Die verwendeten EBA Patientenseren wurden uns freundlicherweise von Marcel Jonkman zur Verfügung gestellt (University of Groningen, University Medical Center Groningen, Department of

Dermatology, The Netherlands). Die Seren der EBA-Patienten wurden vor ihrer Verwendung von der Arbeitsgruppe durch die folgenden Versuche charakterisiert: 1) positive Reaktion in der indirekten Immunfluoreszenz; 2) Bindung an der dermalen Seite humaner 1 M Salz-Spalthaut; 3) Bindung an ein 290 kDa schweres Protein entsprechend dem humanen Kollagen Typ VII im Immunoblot mit dermalen Extrakten; 4) Bindung an die NC1 Domäne von rekombinantem Kollagen Typ VII im Immunoblot. Dabei zeigten die IgG-EBA Patientenseren nur positive Reaktionen mit anti-Mensch-IgG-Antikörpern, die IgA-EBA Patientenseren nur mit anti-Mensch-IgA-Antikörpern in den genannten Versuchen. Das Serum des BP-Patienten stammt aus der hiesigen Klinik für Dermatologie und wurde mit folgenden Versuchen charakterisiert: 1) positive Reaktion in der indirekten Immunfluoreszenz; 2) Bindung an der epidermalen Seite humaner 1 M Salz-Spalthaut; 3) Bindung an ein 180 kDa schweres Protein im Immunoblot mit Keratinozyten-Extrakten; 4) Bindung im ELISA an das rekombinante Fragment NC16A des BP 180 (siehe 1.2.3). Dieses Serum wurde für die Positivkontrollen angewendet. Des Weiteren wurden Seren von gesunden freiwilligen Spendern (NHS) als Negativkontrollen genutzt. Für das Gefrierschnittmodell (siehe 2.7) wurden Leukozyten isoliert, auch hierfür diente das Blut gesunder Freiwilliger als Quelle.

2.4 Charakterisierung rekombinanter Autoantikörper

2.4.1 Herstellung von Gefrierschnitten humaner neonataler Vorhaut

Für einige der folgenden Versuche wurden Gefrierschnitte aus humaner neonataler Vorhaut verwendet. Diese Vorhaut stammt von kinderchirurgischen Routineeingriffen und wurde für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung gestellt. Ein Votum der Ethikkommission liegt hierfür vor. Die Herstellung dieser Gefrierschnitte wird hier exemplarisch dargestellt und in den folgenden Kapiteln an diese Stelle verwiesen. Für die Gewinnung der Gefrierschnitte wurde humane neonatale Vorhaut bis zur Verwendung in RPMI gelagert (Roswell Park Memorial Institute medium, BioWhittaker, Verviers, Belgien). Zunächst wurde die Haut in kaltem PBS (Phosphate-buffered saline) gewaschen und in jeweils 5 - 15 mm große Stücke zerteilt. Diese wurden mit Tissue-Tek O.C.T. Compound Einbettmediu (Sakura Finetec Inc. USA) in Cryomolds (Tissue-Tek Cryomold, Sakura Finetec Inc., USA) überschichtet und bei -80 °C gefroren. Mit Hilfe eines Kryostaten (Leica CM 3050 S, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) wurden die Stücke dann in 6 µm dicke Schnitte bei -20 °C geschnitten. Es wurden jeweils zwei Hautschnitte á ca. 10 x 10 mm Größe auf chemisch gereinigte Objektträger (SuperFrost/Plus, Gerhard Men-

zel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig) übertragen. Die fertigen Schnitte bzw. Objektträger wurden bei - 20 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz

In der indirekten Immunfluoreszenz wird die Fähigkeit der rekombinanten Antikörper an natives Kollagen VII binden zu können untersucht, indem Kryoschnitte humaner Haut mit diesen inkubiert werden. Die Ablagerung der rekombinanten Autoantikörper auf den Kryoschnitten neonataler Vorhaut wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz wie folgt beurteilt (Zillikens *et al.* , 1996): Hierzu wurden die rekombinanten IgA1- und IgA2- sowie zur Kontrolle IgG1-Autoantikörper und als Negativkontrolle normales humanes Serum (NHS, siehe 2.3) mit PBS zu Konzentrationen von 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt. Um ein Vermischen der Proben auf den Objektträgern zu verhindern, wurden die Gefrierschnitte mittels eines Striches mit einem Ölstift (DAKO Pen, DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) voneinander getrennt. Als nächstes wurden die Schnitte mit jeweils 50 μ l der Proben in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 Minuten in PBS wurden die Schnitte in einem abgedunkelten Raum mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern beschichtet. Nach erneuter Inkubation und dreimaligem Waschen für 5 Minuten wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop die Bindung der Antikörper an die Basalmembran beurteilt. Für die Fluoreszenzmarkierung der IgA-Autoantikörper wurden dabei FITC-konjugierte polyklonale Ziege-anti-Mensch-IgA-Antikörper (Biorad, Deutschland, Produktnummer 30240C) und FITC-konjugierte polyklonale Ziege-anti-Mensch-IgG-Antikörper (Sigma-Aldrich, Großbritannien, Produktnummer F-5512), jeweils 1:50 verdünnt in PBS, verwendet. Zur Differenzierung von IgA1 und IgA2 wurden zudem biotinylierte monoklonale Maus-anti-Mensch-IgA1 (Nordic Labs, Niederlande) und Maus-anti-Mensch-IgA2 (Nordic Labs, Niederlande), Endkonzentration 10 μ g/ml in PBS, verwendet. Dabei wurde ein weiterer Inkubationsschritt mit FITC-konjugiertem Streptavidin (DAKO, Deutschland) 1:200 in PBS angehängt. Bei der Beurteilung mittels Fluoreszenzmikroskopie wird eine lineare Ablagerung an der dermoepidermalen Junktionszone als Fähigkeit an natives Typ VII Kollagen zu binden gewertet.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um das korrekte Molekulargewicht der rekombinanten Autoantikörper zu bestimmen, wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) unter reduzierenden und

nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Hierbei werden die Proteine nach der Laemmli-Methode (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Durch dieses Verfahren können Proteine nach der Behandlung mit anionischer Detergenz durch das Anlegen einer Spannung nach ihrem spezifischen Gewicht aufgetrennt werden. Somit können die Antikörper unter reduzierenden Bedingungen in ihre leichten und schweren Ketten separiert und unter nicht-reduzierenden Bedingungen als gesamter Antikörper dargestellt werden. Es wurden hierfür eindimensionale, diskontinuierliche Zweikomponenten-SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet. Für die Aufbereitung der Proben wurden die Autoantikörper mit 5-fach SDS-Probenpuffer verdünnt, 4 Minuten bei 95 °C erhitzt, kurz bei 13.000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge Haereus, Festwinkelrotor #3328) und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt. Zur Fokussierung der Proben wurde vor dem eigentlichen Trenngel ein Sammelgel vorgeschaltet. Daher wurde nach dem Gießen des Trenngels in eine vertikale Gel-Kassette (Mini-Protean 3 Cell, BioRad) mit 0,75 mm Spacern das Gel für eine Polymerisationszeit von 30 Minuten mit Ethanol beschichtet. Dies bewirkt eine gleichmäßigere Oberfläche für das folgende Sammelgel. Als nächstes wurde das Ethanol abgekippt, das Sammelgel darüber gegossen und der Probenkamm in das Gel gedrückt. Die Polymerisationszeit betrug wieder 30 Minuten. Es wurden jeweils 5%ige Sammelgele, für die nicht-reduzierenden Gele 12%ige Trenngele und für die reduzierenden Gele 7%ige Trenngele gegossen. Die rekombinanten Autoantikörper IgA1, IgA2 und IgG1 wurden nacheinander in die Kammern aufgetragen. Als Marker für die Molekulargewichte wurden BenchMark Protein Ladder (Invitrogen) bzw. Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte in der Mini-PROTEAN 3 Elektrophorese-Kammer mit 5-fach-SDS-PAGE-Laufpuffer. Zunächst wurde für ca. 60 Minuten bei 12 Watt die Elektrophorese durchgeführt, bis die Farbfront des Probenpuffers den unteren Gelrand erreicht hatte.

2.4.4 Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung der SDS-Gele

Um die rekombinanten Autoantikörper im SDS-Gel sichtbar zu machen, wurden die Trenngele für 30 Minuten auf dem Schüttler in Coomassie-Brilliant-Blue (R250) Färbelösung gebracht (2 g/l Coomassie-Brilliant-Blue R250, 450 ml Methanol, 100 ml Essigsäure 100% ad 1000 ml ddH₂O). Im Weiteren wurden die Gele über dreimal 5 Minuten in Entfärbelösung (450 ml Methanol, 100 ml Essigsäure 100% ad 1000 ml ddH₂O) unter dreimaligem Wechseln der Lösung entwickelt. Dieser letzte Schritt wurde verwendet, um vor allem den Hintergrund zu entfärben und die Banden klarer erscheinen zu lassen. Die Gele wurden im Anschluss zur Dokumentation fotografiert.

2.4.5 Westernblot

Für den Nachweis der Bindungsfähigkeit der Autoantikörper an dermalen Extrakten wurde ein Immunoblot mit dermalen Extrakten durchgeführt. Hierfür wurden Nitrozellulosemembranen, die freundlicherweise durch das Autoimmunlabor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie zur Verfügung gestellt wurden, wie beschrieben verwendet (Zillikens *et al.*, 1996). Die Nitrozellulosestreifen von ca. 5 mm Breite wurden zunächst mit 1% biotinfreiem BSA (Carl Roth, Deutschland) und 0,1% Tween-20 in PBS (BSA-PBS-T) geblockt. Nach zweimaligem Waschen für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 0,1% Tween-20 in PBS (PBS-T) wurden die Streifen mit Antikörpern (ca. 10 µg/ml) oder Isotypkontrollen von IgA1 und IgA2 in BSA-PBS-T für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte für den Nachweis von IgA die Detektion mit Peroxidase-konjugierten polyklonalen Kaninchen-anti-Mensch-IgA-Antikörpern (DAKOCytomation, Deutschland, Produktnummer PO216). Für den IgG-Nachweis erfolgte die Detektion mit Peroxidase-konjugierten polyklonalen Kaninchen-anti-Mensch-IgG-Antikörpern (DAKOCytomation, Deutschland, Produktnummer PO214). Die Färbung wurde nach erneutem Waschen durch Zugabe von 5% Diaminobenzidin und 0,01% H₂O₂ in ddH₂O entwickelt und durch Waschen in ddH₂O gestoppt. Nach Trocknen der Streifen erfolgte die visuelle Auswertung. Hierbei wurde beurteilt, ob eine Bindung an das 290 kDA schwere Protein entsprechend dem Kollagen Typ VII erfolgte.

2.5 Indirekter Komplementbindungstest

Die Komplementaktivierung trägt in der Pathogenese subepidermal blasenbildender Autoimmundermatosen einen wichtigen Anteil (Sitaru *et al.*, 2005). Daher wurde im indirekten Komplementbindungstest die Fähigkeit der rekombinanten Autoantikörper hinsichtlich einer Komplementaktivierung beurteilt. (Hodge *et al.*, 1978; Katz *et al.*, 1976). Dabei wird die Fähigkeit der IgA-Autoantikörper eine Komplementablagerung an der dermo-epidermalen Junktionszone hervorzurufen untersucht. Hierfür wurden die rekombinanten Autoantikörpern IgA1, IgA2 und IgG1 in PBS zu Konzentrationen von 1:10, 1:30, 1:90, 1:270 und 1:810 verdünnt. Als Negativkontrolle wurde Serum von einem gesunden freiwilligen Spender, in einer Konzentration von 1: 5 in PBS verdünnt, verwendet. Als Positivkontrolle fungierte hierbei rekombinantes IgG1. Hierzu wurden jeweils 50 µl einer Probe auf einen Kryoschnitt humaner Vorhaut (siehe 2.4.1) aufgetragen und abgedeckt um anschließend in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert zu werden. Danach wurden die Schnitte zunächst zweimalig für

10 Minuten in PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde jeweils 50 μl von gesunden Spendern gewonnenes normales humanes Plasma zu 1:5 mit Veronalpuffer verdünnt als Komplementquelle hinzugegeben und für 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen für 10 Minuten in PBS wurden jeweils 50 μl FITC-konjugierte polyklonale anti-human-C3-Antikörper hinzugefügt und ein letztes Mal für 30 Minuten inkubiert. Hiermit erfolgte die Markierung von C3-Komplement. Es folgte ein erneuter Waschschrift für zweimal 10 Minuten in PBS. Als letzter Schritt wurden die Objektträger mit jeweils 100 μl Glycerin, 1:1 mit PBS versetzt, benetzt und mit Deckgläsern vorsichtig abgedeckt. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie und Fotografie der Schnitte. Eine dosisabhängige Markierung und somit Ablagerung von C3-Komplement entlang der dermo-epidermalen Junktionszone zeigt hierbei die Fähigkeit des Antikörpers, Komplement zu aktivieren. Eine fehlende Ablagerung hingegen zeigt, dass dieser Antikörper nicht in der Lage ist, Komplement zu aktivieren.

2.6 ROS-Release von neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit immobilisierten Autoimmunkomplexen

In der Pathogenese von Antikörpern gegen die dermo-epidermale Junktionszone spielt ebenfalls die Stimulation von neutrophilen Granulozyten zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) eine wesentliche Rolle. Im folgende Versuch wurde daher die Fähigkeit der rekombinanten Antikörper die ROS-Produktion zu stimulieren (ROS-Release) untersucht. Hierbei handelt es sich um ein *in vitro* Krankheitsmodell, welches von Dr. Yu und Kollegen entwickelt wurde. In dem ursprünglichen Modell wurden neutrophile Granulozyten mit immobilisierten Immunkomplexen auf Microtiterplatten stimuliert (Yu *et al.* , 2010). In dem hier durchgeführten modifizierten Assay wurden Microtiterplatten mit rekombinanten Autoantigenfragmenten (hCOL7EF) beschichtet und nachfolgend mit unterschiedlichen Dosen der verschiedenen rekombinanten Autoantikörper-Proben versetzt. Zusätzlich wurden die Platten mit polymorphkernigen Leukozyten, zu 90 % aus neutrophilen Granulozyten bestehend, inkubiert. Dieser Versuch wurde mit sechs unterschiedlichen Spendern durchgeführt. Nachfolgend wird zunächst die Isolierung der neutrophilen Granulozyten und im Anschluss die Durchführung des ROS-Release beschrieben.

Isolierung neutrophiler Granulozyten mit Polymorphprep

Zunächst wurden vier 15 ml-Tubes (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) vorbereitet, in welche jeweils 5 ml Polymorphprep (Fresenius Kabi Norge AS, Oslo, Norwegen) pipettiert wurde. Für die Gewinnung von neutrophilen Granulozyten wurde 36 ml Blut von gesunden freiwilligen Spendern (n=6) verwendet. Hierzu erfolgte die Blutentnahme mit einer Butterflykanüle (BD Valu Set, Beckton Dickinson GmbH, Heidelberg) und vier 9 ml-Röhrchen, denen EDTA zur Antikoagulation zugesetzt war (Monovette EDTA, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht). Das Blut wurde anschließend in die vorbereiteten Tubes überführt, indem das Polymorphprep vorsichtig mit jeweils 5 ml Blut bedeckt wurde. Als nächstes wurden die Tubes ca. 51 Minuten mit 500 g (ca. 1600 rpm) bei Raumtemperatur und ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Hierfür wurde die Varifuge 1.0 R, Heraeus Instruments, GmbH, Hanau verwendet. Durch die Zentrifugation bilden sich in den Röhrchen Zellbanden aus. In der obersten Bande befinden sich nun die mononukleären Zellen, wie Lymphozyten und Monozyten, und in der zweiten Bande befinden sich die benötigten Granulozyten. Zwischen diesen Banden ist Plasma. Daher wurde zunächst die oberste Bande und die Plasmaschicht aus jedem Tube mit einer automatischen Pipette (Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt) aufgenommen und verworfen. Als nächstes wurden die zweiten Banden vorsichtig aufgenommen und in zwei 50 ml-Tubes (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) gesammelt. Dieser Granulozytensuspension, von ca. 10 ml pro Tube, wurde die gleiche Menge Halbmedium (RPMI 1640 verdünnt mit LPS-freiem ddH₂O im Verhältnis 1:1) zugefügt und mit RPMI-Medium (Lonza RPMI 1640 mit L- Glutamin, BioWhittaker, Verviers, Belgien) auf 50 ml aufgefüllt. In einem weiteren Schritt wurden die Röhrchen erneut 10 Minuten bei 400 g (ca. 1400 rpm) mit Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Es bildet sich dadurch ein Pellet am Boden des Tubes und ein Überstand darüber. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Pellet wurde als Nächstes kurz angerüttelt und mit der automatischen Pipette unter Hinzufügen von 6 ml eiskaltem Lysepuffer resuspendiert (LPS-freies D-PBS verdünnt mit LPS-freiem ddH₂O im Verhältnis 1:5). Nach 30 Sekunden Inkubation wurde diese Lösung mit RPMI auf 50 ml aufgefüllt. Es folgte für 10 Minuten ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 400 g (ca. 1400 rpm) bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet mit 20 ml Chemilumineszenz-Medium resuspendiert (CL-Medium, RPMI-1640 ohne Phenolrot mit stabilisiertem L- Glutamin, mit 25 mM HEPES, Biochrom AG, Berlin). Für weitere 10 Minuten erfolgte ein letzter Zentrifugationsschritt bei 400 g (ca. 1400 rpm) bei Raumtemperatur. Nun wurde erneut der Überstand abgesaugt und zuletzt das Pellet mit 5 ml CL-Medium resuspendiert. Es wurde mit der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl der Granulozyten-

suspension bestimmt. Die weitere Verdünnung der Zellsuspension im nächsten Schritt wurde jeweils abhängig von der ermittelten Zellzahl gewählt. Dabei wurde eine Zielkonzentration von ca. 2×10^6 /ml angestrebt. Die Granulozytensuspension wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert und erst direkt vor dem Pipettieren in die Wells mit Luminol-Lösung versetzt. Die Herstellung der Luminol-Lösung erfolgte zuvor aus 2 mg Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion, Roche Diagnostics, Mannheim), gelöst in 8 μ l NaOH und mit 1 ml ddH₂O aufgefüllt.

ROS-Release

Hierfür erfolgte die Vorbereitung der Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) durch Coating für drei Stunden bei Raumtemperatur mit je 50 μ l hCOL7EF-Fragmenten in einer Konzentration von 20 μ g/ml in Carbonatpuffer, pH 9.6. Danach wurde die Platte im ELISA-Washer (Columbus Pro, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) mit Waschpuffer (PBS mit 0,05% Tween) gewaschen, um überschüssige nicht gebundene Antigene zu entfernen. Im Weiteren wurde die Platte mit je 100 μ l Blockingpuffer (PBS mit 1% biotinfreiem BSA und 0,05% Tween) pro Well geblockt. Als nächster Schritt erfolgte eine Inkubation für 1 Stunde auf dem Schütteltisch (TPM 4, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) und erneutes Waschen im ELISA-Washer. Die rekombinanten Autoantikörper IgA1, IgA2 bzw. IgG1 wurden in einem Zwischenschritt in einer Verdünnungsreihe von 1:122 bis 1:40500 mit Blockingpuffer verdünnt. Nun wurden jeweils 50 μ l der rekombinanten Autoantikörper IgA1, IgA2 bzw. IgG1 oder die Positiv- bzw. Negativkontrolle in einer Verdünnungsreihe in die jeweiligen Wells pipetiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert. In jedes Well wurde nun 100 μ l CL-Medium vorgelegt und je 100 μ l der vorbereiteten und mit Luminol-Lösung versetzten Granulozytensuspension hinzugefügt. Direkt im Anschluss erfolgte die photometrische Auswertung im VICTOR3-Reader (Perkin-Elmer USA). Dabei wurde die optische Dichte (OD) bei 450 nm und 37 °C in einminütigen Intervallen mit 60 Wiederholungen gemessen. Die Daten wurden als relative Lichteinheiten (RU) in einer Kinetik erfasst. Als Leerwertkontrolle wurde die optische Dichte von Hexa-Lösung (5% Hexadecyltrimethyl-ammoniumbromid in ddH₂O) verwendet. Dieser Leerwert wurde von den anderen Proben substrahiert. Bei diesem Versuch korreliert die gemessene optische Dichte mit der ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten.

Als Negativkontrolle wurde dabei normales humanes Serum (NHS) und als Positivkontrolle FMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine) verwendet. FMLP ist ein starker

Stimulator der Chemotaxis und induziert eine Degranulation der Granulozyten. Dieser Versuch wurde sechsmal wiederholt.

Auswertung

Die gemessenen Werte wurden mit dem Wallac 1420 Manager und mit Sigma 11.1 statistisch ausgewertet. Dazu wurden die Kinetiken separater Experimente zur Area unter curve (AUC) zusammengefasst und für die einzelnen Spender auf die Zellkontrolle mit Hexa-Lösung (ohne Stimulation) normalisiert. Die statistische Beurteilung erfolgte mittels adjustiertem Jonckheere-Terpstra-Test.

2.7 Gefrierschnittmodell

Einer der gemeinsamen Endpunkte der einzelnen Pathogenesefaktoren der blasenbildenden Autoimmundermatosen ist die Induktion einer dermo-epidermalen Separation, welche die Blasenbildung bei den Patienten widerspiegelt. Daher wurde in dieser Arbeit die Fähigkeit der Autoantikörper eine dermo-epidermale Separation hervorzurufen untersucht. In dieser Versuchsreihe wurden Gefrierschnitte humaner neonataler Vorhaut (Herstellung siehe 2.4.1) mit den verschiedenen rekombinanten Autoantikörpern sowie Patientenserum und frisch isolierten Leukozyten inkubiert. Im Anschluss wurde nach Anfärben der Schnitte unter dem Mikroskop eine mögliche Spaltbildung an der dermo-epidermalen Junctionszone beurteilt. Im Folgenden wird der Versuch in seinen Einzel-Schritten dargestellt.

Isolierung peripherer Leukozyten

Für die Gewinnung von peripheren Leukozyten wurde von gesunden freiwilligen Spendern 80 ml Vollblut verwendet und mit 4 ml Heparin (Heparin-Natrium 25.000 I.E./ml, ratiopharm GmbH, Ulm) antikoaguliert. Hierzu wurde den Spendern mit einer Butterflykanüle (BD Valu Set, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) und vier 20 ml-Spritzen (BD Discardit II, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg), die jeweils mit 0,5 ml Heparin versetzt wurden, Blut abgenommen. Zusätzlich wurden jeweils 20 ml einer 3%-igen Dextranlösung (Dextran 500, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) mit 0,9% NaCl (Natriumchlorid, J.T. Baker, Deventer, Holland) versetzt und in vier 50 ml-Tubes (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) befüllt. In diese vorbereiteten Tubes wurde das abgenommene Blut überführt und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. Während dieser Zeit

bildeten sich zwei Phasen, wobei die untere Phase den überwiegenden Anteil der Erythrozyten enthielt und die obere Phase Granulozyten, Lymphozyten sowie Monozyten beinhaltete. Diese Überstände wurden in drei neue 50 ml-Tubes übertragen. Es folgte eine Zentrifugierung bei 1200 rpm bei Raumtemperatur (Varifuge 3.0 R, Heraeus Instruments GmbH, Hanau). Dadurch bildeten sich am Boden der Tubes Pellets, welche die Zellen enthielten, und darüber ein Überstand. Diese Überstände wurden abgesaugt und verworfen. Die drei Pellets wurden jeweils mit 10 ml RPMI (Lonza RPMI 1640 mit L-Glutamin, BioWhittaker, Verviers, Belgien) resuspendiert und in ein gemeinsames Tube überführt. Nach erneuter 12 minütiger Zentrifugation mit 1200 rpm bei Raumtemperatur wurde der Überstand wieder verworfen. Anschließend wurde das Pellet zuerst mit 20 ml eiskalter 0,2%-iger NaCl-Lösung und nach 20 Sekunden zusätzlich mit 20 ml eiskalter 1,6%-iger NaCl-Lösung resuspendiert. Es folgte ein erneutes Zentrifugieren bei 1200 rpm für 12 Minuten, jedoch bei 4 °C. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet mit 30 ml RPMI-Medium resuspendiert sowie für 7 Minuten bei 1200 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Letztmalig wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 9 ml RPMI resuspendiert. Die so gewonnene Zellsuspension, hauptsächlich aus Leukozyten bestehend, wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Die Leukozytenspender wiesen anamnestisch keine Vorerkrankungen auf und nahmen keine immunsuppressiven Medikamente ein. Der Gefrierschnitt-Versuch wurde zwanzig mal durchgeführt mit Blut von insgesamt 15 Spendern, 12 Frauen und 3 Männern. Vor der Blutentnahme wurden alle Spender über die Untersuchung mündlich und schriftlich aufgeklärt und eine Einverständniserklärung wurde unterschrieben.

Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Um die Zellvitalität zu bewerten, wurde 10 μl der Zellsuspension mit 440 μl PBS und 50 μl Trypanblau in einem Eppendorfgefäß versetzt (Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Von dieser Suspension wurden 10 μl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop (Wilovert S, Helmut Hund GmbH, Wetzlar) bei 10-facher Vergrößerung bewertet. Bei abgestorbenen Zellen kann durch die defekte Zellwand der Farbstoff eindringen, die avitale Zelle erscheint somit blau gefärbt. Vitale Zellen dagegen stellen sich weiterhin farblos dar. Die so bestimmte Vitalität der Zellen lag an jedem Versuchstag über 90%. Zusätzlich wurden in der Neubauer-Zählkammer die Zellen in zwei Quadranten gezählt. Durch folgende Rechnung wurde die Zellzahl je Mililiter der Suspension bestimmt: $\text{Summe der zwei Quadrate} \times \frac{1}{2} \times 10^4 \text{ Zellen/ml} \times 50$. Die ermittelte Zellzahl lag zwischen 2,25 und $6,25 \times 10^7$ Zellen/ml, im Durchschnitt bei $3,78 \times 10^7$ Zellen/ml.

Bestimmung der optimalen Konzentration der rekombinanten Autoantikörper für den Einsatz im Gefrierschnittmodell

Die Autoantikörper IgA1, IgA2 und IgG1 wurden mit DyLight Amine-Reactive Fluors, DyLight 488 NHS Ester (Thermo Scientific, USA) nach der Anleitung des Herstellers fluoreszenz markiert. Hierfür musste zunächst der Lösungspuffer der Autoantikörperproben getauscht werden. Dazu wurden jeweils 100 μl der rekombinanten Autoantikörper mittels der Zeba Spin Desalting Columns, 7 K MWCO (Thermo, Scientific, USA) gemäß der Herstellerangabe in 300 μl 0,05 M Natriumborat Puffer, pH 8,5 überführt. Im Anschluss wurden diese Proben mit 50 μg des DyLight 488 NHS Esters fluoreszenzmarkiert und erneut mittels der Zeba-Säule in 300 μl PBS überführt. Diese mit DyLight markierten Autoantikörperproben wurden im Anschluss in PBS weiter zu Konzentrationen von 1:3, 1:9, 1:27, 1:81, 1:243, 1:729, 1:2187 und 1:6561 verdünnt. Hiervon wurden jeweils 50 μl auf Objektträger mit Gefrierschnitten humaner Vorhaut aufgetragen und 30 Minuten inkubiert. Nach zweimal 10 Minuten Waschen wurden die fluoreszenz-markierten Autoantikörper unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt. Hierbei wurde die Intensität des Fluoreszenzsignals der Autoantikörper entlang der dermo-epidermalen Junktionszone mit ImageJ analysiert. Dieses Fluoreszenzsignal der DEJ wurde auf das Hintergrundsignal der Epidermis und Dermis wie folgt normalisiert:

$$Norm\ Wert = \frac{Messwert\ DEJ - min}{max - min} \quad (2.1)$$

Mit *Norm Wert*: normalisierter Wert; *Messwert DEJ*: gemessener Wert an der DEJ; *min*: minimal gemessener Hintergrund-Wert von Epidermis und Dermis; *max*: maximal gemessener Hintergrund-Wert von Epidermis und Dermis.

Mittels dieser Werte wurde eine nicht-lineare Sigmoid-Regressionskurve erstellt, um die optimale zu verwendene Konzentration der Autoantikörper im Gefrierschnittmodell zu ermitteln. Damit sollte sichergestellt werden, dass die Konzentrationen den Sättigungsbereich der Antikörper von 5% bis 95% abdecken.

Herstellung der zu testenden Proben

Im Gefrierschnittmodell wurden sowohl die rekombinanten Autoantikörper IgA1, IgA2 und IgG1 als auch das Serum eines IgG-EBA-Patienten sowie das Serum und das Plasmaphereseprodukt eines IgA-EBA-Patienten untersucht. Als Positivkontrolle wurde das Serum eines BP-Patienten, als Negativkontrolle Serum gesunder freiwilliger Spender eingesetzt. Die Proben wurden mit PBS in verschiedenen Konzentrationen verdünnt.

Dabei wurden für IgA1 die Konzentrationen 1:21, 1:63, 1:198, 1:567 und 1:1701, für IgA2 1:22, 1:67, 1:201, 1:603 und 1:1809 verwendet, für IgG1 1:25, 1:76, 1:228, 1:684 und 1:2052, für die Proben der EBA 1:3, für BP 1:16 und für die Negativkontrolle 1:3 verwendet.

Inkubation der Gefrierschnitte

Zunächst wurden die Gefrierschnitte aufgetaut und die beiden Schnitte auf einem Objektträger mittels eines Striches mit einem Ölstift (DAKO Pen, DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) getrennt. Dies verhinderte das Vermischen der verschiedenen Seren beim Auftragen. Im Weiteren wurden auf die Hautschnitte 50 μ l der jeweiligen Autoantikörper oder Seren in den oben genannten Konzentrationen aufgetragen. Im Anschluss wurden die Schnitte in einer Feuchtkammer (Werner Hassa GmbH, Lübeck, Deutschland) für eine Stunde bei 37 °C und 5% CO₂ im Begasungsbrutschrank (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) inkubiert. Als nächstes wurden die Präparate für 5 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Herstellung von Injektionskammern für die Inkubation der Leukozyten auf den mit Proben bzw. Patienten-Seren versetzten Schnitten. Hierfür wurden die Objektträger mit einem zweiten Objektträger abgedeckt. Dabei wurde auf dem zweiten Objektträger an den beiden äußeren Seiten durch mehrfache Umwicklung mit Parafilm (Parafilm M Laboratory Film, Pechiney Plastic Packaging, Menasha, Wisconsin, USA) ein Rand gebildet. Die beiden Objektträger wurden aufeinander gelagert und von außen mit Parafilm fixiert. Durch den so gebildeten Spalt zwischen den beiden Trägern entstand eine Injektionskammer von etwa 1 mm Höhe. In diese wurde 500 μ l der vorbereiteten Zellsuspension injiziert. Es folgte eine erneute Inkubation im Begasungsbrutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ für drei Stunden. Als weiterer Schritt wurden die Kryoschnitte in PBS so lange gewaschen bis die Leukozyten aus den Präparaten herausgelöst waren. Dies wurde mikroskopisch bei einer 20-fachen Vergrößerung (Mikroskop Wilovert S, Helmut Hund GmbH, Wetzlar) kontrolliert. Dabei sollte die dermo-epidermale Junktionszone gut einsehbar und frei von Leukozyten sein.

Fixierung und Färbung der Kryoschnitte

Hierfür wurden als Erstes die Schnitte für 5 Minuten in Formalin fixiert und unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung der Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin. Dazu wurden diese 4 Minuten mit der Kernfärbung nach Papanicolaou gefärbt und dann unter Leitungswasser gewaschen. Danach wurden sie

20 Sekunden in Essigsäure-Alkohol geschwenkt und erneut mit Leitungswasser ab-
gespült. Als nächstes wurden die Schnitte für 10 Sekunden in Ammoniakwasser ge-
schwenkt und erneut abgespült. Im Anschluss wurden sie 2 Minuten in Eosin gefärbt.
Als nächster Schritt folgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe von
zweimal 96%-igem und 100%-igem Alkohol sowie Xylol. Zuletzt wurden die gefärbten
Kryoschnitte mit einem Glaseindeckautomaten (Leica CV 5030, Leica Mikrosysteme
Vertrieb GmbH, Wetzlar) eingedeckt. Die Auswertung der Schnitte erfolgte am Mikro-
skop (Olympus BX40, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) in 20× und 40× Ver-
größerung.

Mikroskopische und statistische Auswertung

Die Bestimmung der Spaltbildung an der dermo-epidermalen Junctionszone erfolgte
blind. Die Spaltbildung wurde dabei prozentual als Anteil der zerstörten DEJ an der
gesamten DEJ beziffert. Die Schnitte wurden zusätzlich mit dem Programm ProgRes
Capture 2.1 unter dem Mikroskop fotografiert.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Gnu R (open source software).

3 Ergebnisse

Zur Untersuchung der pathogenetischen Bedeutung wurden rekombinante Autoantikörper verwendet, welche gegen menschliches Typ VII Kollagen gerichtet sind. Hierbei handelt es sich um chimäre Antikörper, deren variable Domänen mittels *Phage Display* aus Mäusen selektiert wurden, welche mit rekombinanten Fragmenten der immundominanten NC1-Domäne von humanem Typ VII Kollagen immunisiert wurden (Recke *et al.* , 2010). Die murinen variablen Domänen wurden rekombinant mit verschiedenen konstanten Domänen menschlicher Immunglobuline gekoppelt und in HEK293-Zellen nach transienter Transfektion als komplette Antikörper exprimiert. Für diese Arbeit wurden drei rekombinante Konstrukte verwendet, welche für die humanen konstanten Domänen von IgG1, IgA1 und IgA2 Schwerketten enthielten. Diese wurden zusammen mit κ -Leichtketten durch unseren Kooperationspartner Gestur Vidarsson (Universität von Amsterdam) exprimiert und in Form von Zellkulturüberständen zur Verfügung gestellt.

3.1 Charakterisierung der rekombinanten Autoantikörper

Die rekombinanten Autoantikörper vom IgG1-Typ wurden mittels Protein-G-Affinitätschromatographie aus Zellkulturüberständen aufgereinigt. Für IgA1 und IgA2 wurde eine thiophile Ausschlusschromatographie zur Aufreinigung verwendet.

Zur Charakterisierung und Untersuchung der Bindungseigenschaften der rekombinanten Autoantikörper wurden die im Folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt.

3.1.1 Korrektes Molekulargewicht der rekombinanten Autoantikörper

Um nachzuweisen, dass die Autoantikörper das korrekte Molekulargewicht aufweisen, wurden diese mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen untersucht (Abb. 3.1A und B). Die Antikörper wurden hierzu auf ein Polyacrylamid-Gel geladen und durch das Anlegen einer Spannung aufgetrennt. Die separierten Banden wurden mit Coomassie Brillant-Blau gefärbt. Die leichten Ketten separierten bei 20 kDa, die schweren Ketten bei 50 kDa unter reduzierenden Bedingungen (Abb. 3.1A). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen separierten die Autoantikörper als komplette Heterotetramere, welche jeweils aus zwei leichten und zwei schweren Ketten bestehen (Abb. 3.1B). Eine zusätzliche Separierung in höheren Molekulargewichten entspricht dem zusätzlichen Vorliegen in polymerer Form. Diese Ergebnisse wurden in zwei weiteren Versuchen bestätigt. Für IgA ist bekannt, dass es sowohl in monomerer als auch in polymerer Form im menschlichen Körper vorkommt (Kerr, 1990).

3.1.2 Bindungsfähigkeit der rekombinanten Autoantikörper

Für den Nachweis der Bindungsfähigkeit der Autoantikörper auch bei in der Routine eingesetzten diagnostischen Verfahren wurden diese im Westernblot mit dermalen Extrakten und auf Kryoschnitten untersucht.

Außerdem wurden die rekombinanten Autoantikörper im Immunoblot mit dermalen Extrakten untersucht um nachzuweisen, dass diese an dermales Extrakt binden. Es konnte in zwei unabhängig von einander durchgeführten Versuchen eine spezifische Bindung der Antikörper an das 290 kDa schwere Protein entsprechend dem humanen Kollagen Typ VII gezeigt werden (Abb. 3.1C). Die mitgetesteten Isotypkontrollen zeigten keine Bindung.

Um weiterhin nachzuweisen, dass die rekombinanten Autoantikörper auch an natives Kollagen Typ VII binden können, wurden Kryoschnitte neonataler humaner Haut mit diesen inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit FITC-markierten monoklonalen anti-IgA-Antikörpern. Bei den rekombinanten IgA-Autoantikörpern sowie bei der Positivkontrolle mit rekombinatem IgG zeigte sich deutlich eine lineare Ablagerung an der dermoepidermalen Junctionszone (DEJ) (Abb. 3.1D). Dieser Versuch wurde wiederholt durchgeführt.

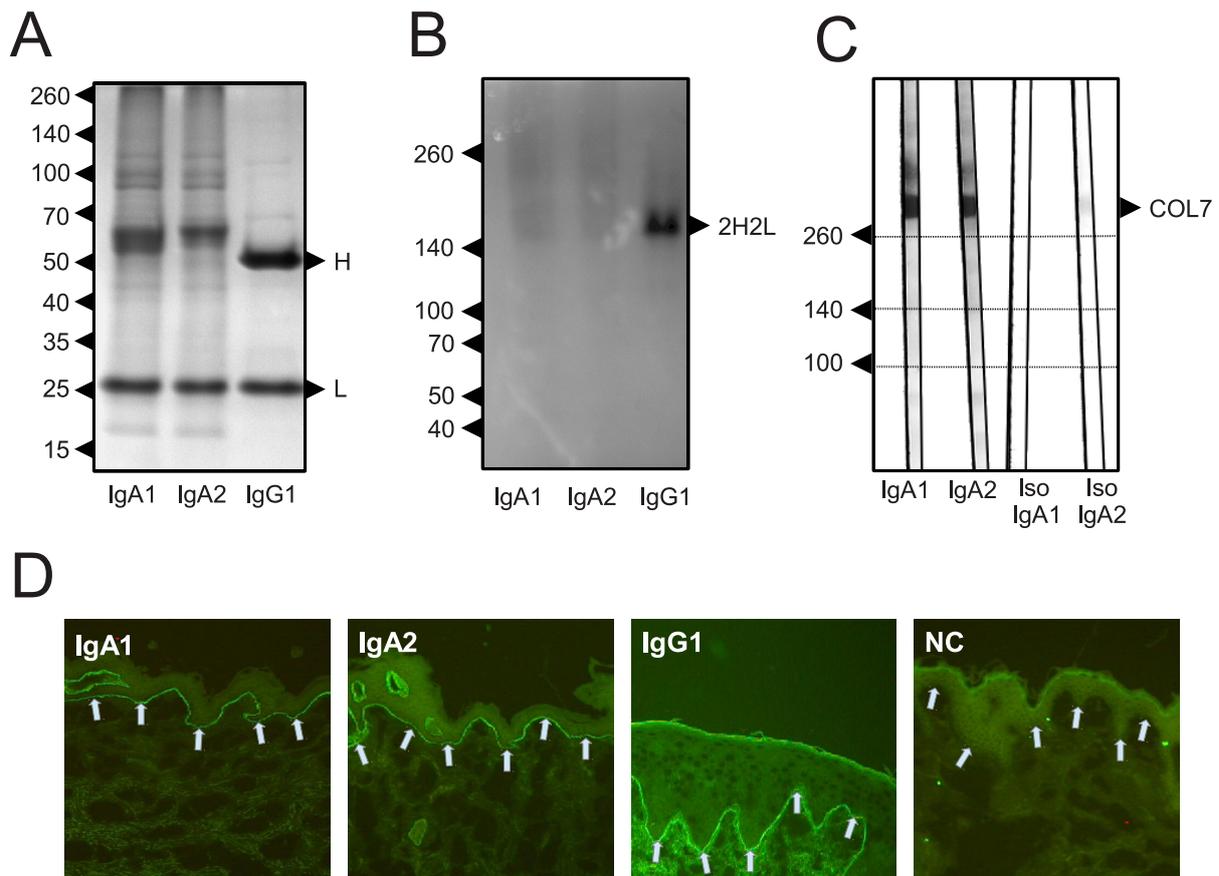


ABBILDUNG 3.1 – Reinheit, Integrität und Bioaktivität rekombinanter IgA-Autoantikörper. Rekombinante IgA-Autoantikörper zeigen das korrekte Molekulargewicht unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen, binden an Typ-VII-Kollagen-Extrakte humaner Haut sowie an natives Kollagen Typ VII im Kryoschnitt humaner Haut. **A**, Rekombinante Autoantikörper wurden mittels 7% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie blue gefärbt, die leichten und schweren Ketten separierten bei 20 bzw. 50 kDa. **B**, 12% SDS-Page unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigt eine Separation bei 160 kDa der heterotetrameren Autoantikörper. **C**, Die rekombinanten Autoantikörper IgA1 und IgA2 reagieren im Westernblot mit dem 290 kDa schweren Protein entsprechend dem humanen Kollagen Typ VII. Die Isotypkontrollen (IsolG1 und IsolG2) zeigen keine Bindung. **D**, Kryoschnitte von menschlicher Vorhaut wurden mit den rekombinanten Autoantikörpern inkubiert, mittels spezifischen FITC-konjugierten Antikörpern markiert und fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Die Autoantikörper zeigen eine lineare Ablagerung entlang der dermo-epidermalen Junctionszone.

3.2 Fähigkeit rekombinanter IgA-Autoantikörper, Komplement zu aktivieren

Die Komplementaktivierung spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese subepidermal blasenbildender Autoimmundermatosen (Sitaru *et al.*, 2005). Daher sollte untersucht werden, ob auch Autoantikörper vom IgA-Subtyp in der Lage sind, eine Komplementab-

lagerung an der dermo-epidermalen Junktionszone hervorzurufen. IgA-Antikörper aktivieren das Komplementsystem nicht auf dem klassischen Weg, sondern über den alternativen Weg (Hiemstra *et al.* , 1988),(Roos *et al.* , 2001). Daher wurde erwartet, dass die rekombinanten IgA-Autoantikörper kein Komplement aktivieren. Hierfür wurden Kryoschnitte humaner neonataler Vorhaut mit rekombinanten Autoantikörpern der Subklassen IgA1 und IgA2 in verschiedenen Verdünnungsstufen inkubiert. Als Positivkontrolle wurde IgG1 und als Negativkontrolle Serum gesunder Spender verwendet. Als Komplement-Quelle diente frisches Lithium-Heparin-Plasma gesunder Blutspender in Veronal-Puffer. Die lineare Komplementablagerung an der dermo-epidermalen Junktionszone wurde durch einen FITC-konjugierten polyklonalen anti-human C3b Antikörper fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. In der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 3.1C) zeigte sich in drei voneinander unabhängigen Versuchen keine Komplementablagerung bei den mit rekombinanten Autoantikörpern der Subklassen IgA1 und IgA2 inkubierten Schnitten und der Negativkontrolle. In der Positivkontrolle mittels rekombinanten IgG1-Autoantikörpern konnte eine dosisabhängige Ablagerung von C3-Komplement nachgewiesen werden. Für IgG1-Autoantikörper ist die Fähigkeit Komplement zu aktivieren bereits beschrieben (Recke *et al.* , 2010). Für IgA1-Autoantikörper ist eine Aktivierung von Komplement über den alternativen Weg beschrieben, nicht aber eine direkte Komplementablagerung (Daha *et al.* , 2011). Die fehlende Komplementablagerung an der DEJ nach der Inkubation mit den rekombinanten IgA-Autoantikörpern zeigt, dass beide Subklassen nicht in der Lage sind, Komplement zu aktivieren. IgG1 hingegen induziert eine Komplementaktivierung.

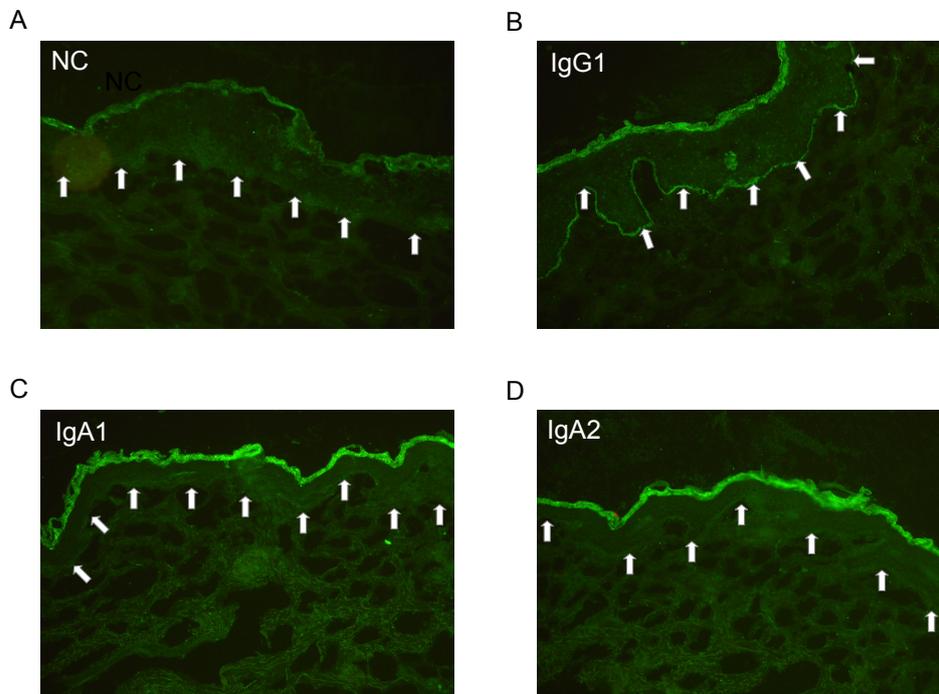


ABBILDUNG 3.2 – Indirekter Komplementbindungstest. Die rekombinanten Autoantikörper IgA1- und IgA2-Subklassen führen nicht zu einer Komplementablagerung an der DEJ. Menschliche neonatale Vorhaut wurde mit rekombinanten IgA1- und IgA2-Autoantikörper-Subklassen sowie mit rekombinanten IgG1-Autoantikörpern als Positivkontrolle und humanem Serum als Negativkontrolle inkubiert. Durch vorhergehende Titrierung der Autoantikörper wurde sichergestellt, dass die getesteten Dosen den Bereich zwischen 5% und 95% der Sättigung abdecken. Als Komplement-Quelle diente frisches Lithium-Heparin-Plasma. Die Ablagerung von Komplement C3b an der DEJ wurde mittels FITC-markierten anti-C3b-Antikörpern in der Fluoreszenz-Mikroskopie sichtbar gemacht. **A-D**, Repräsentative Abbildungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Rekombinante Autoantikörper IgA1 (**C**) und IgA2 (**D**) führten wie die Negativkontrolle (**A**) nicht zu einer Komplementablagerung an der DEJ. IgG (**B**) als Positivkontrolle dagegen bewirkte eine starke Ablagerung von Komplement.

3.3 Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale durch neutrophile Granulozyten nach Stimulation mit immobilisierten IgA-Immunkomplexen

Die Pathogenität von Antikörpern gegen die dermo-epidermale Junktionszone wird durch ihre Fähigkeit bestimmt, neutrophile Granulozyten zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) zu stimulieren (Chiriac *et al.* , 2007). Um die Freisetzung von ROS in einem *in vitro* Krankheitsmodell zu bestimmen wurde von Dr. Yu und Kollegen ein *in vitro* Krankheitsmodell entwickelt. Hierbei werden neutrophile Granulozyten mit immobilisierten Immunkomplexen auf Microtiterplatten stimuliert (Yu *et al.* , 2010). In einem modifizierten Assay wurden Microtiterplatten mit rekombinanten Autoantigenfragmenten (hCOL7EF) beschichtet und nachfolgend mit unterschiedlichen Dosen der verschiedenen rekombinanten Autoantikörper-Proben versetzt. Zusätzlich wurden die Platten mit polymorphkernigen Leukozyten, zu 90 % aus neutrophilen Granulozyten bestehend, inkubiert. Die Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS-Release) wurde durch Messung einer mit Luminol verstärkten Chemilumineszenz in einer Zeitkinetik aufgezeigt. Um die Kinetik zu einem Einzelwert zusammenzufassen, wurde das Szintillations-Signal über die Zeit integriert (Area under curve, AUC). Zuvor wurde eine passende Titrierung auf den Microtiterplatten durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit zwischen den eingesetzten Konzentrationen der unterschiedlichen rekombinanten Autoantikörper zu gewährleisten. Die Konzentration der immobilisierten Immunkomplexe, bestehend aus an hCol7EF gebundenen rekombinanten Autoantikörpern, wurde dabei per Detektion mittels anti-human-Kappa-Antikörpern und Farbreaktion mit TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) bestimmt. Es wurden sechs Verdünnungsstufen von 1:1 bis 1:243 verwendet. Als Negativkontrolle wurde PBS verwendet. Der Versuch wurde mehrfach wiederholt (n=6), wobei frisch aufgereinigte polymorphkernige Leukozyten jeweils verschiedener gesunder Spender verwendet wurden.

Die rekombinanten Autoantikörper der Subklassen IgA1, IgA2 und des Isotyps IgG1 bewirken eine dosisabhängige Freisetzung von intra- und extrazellulären reaktiven Sauerstoffradikalen (Abb. 3.3). Hier zeigt sich auch bei der höchsten Verdünnungsstufe von 1:243 für IgA1 und 2 eine stärkere ROS-Produktion als für die Negativ Kontrolle (adjustierter Jonckheere-Terpstra-Test, p Value= 0,015). Für IgG1 zeigt sich insgesamt eine geringere ROS-Produktion (adjustierter JT-Test, p Value = 0,0168).

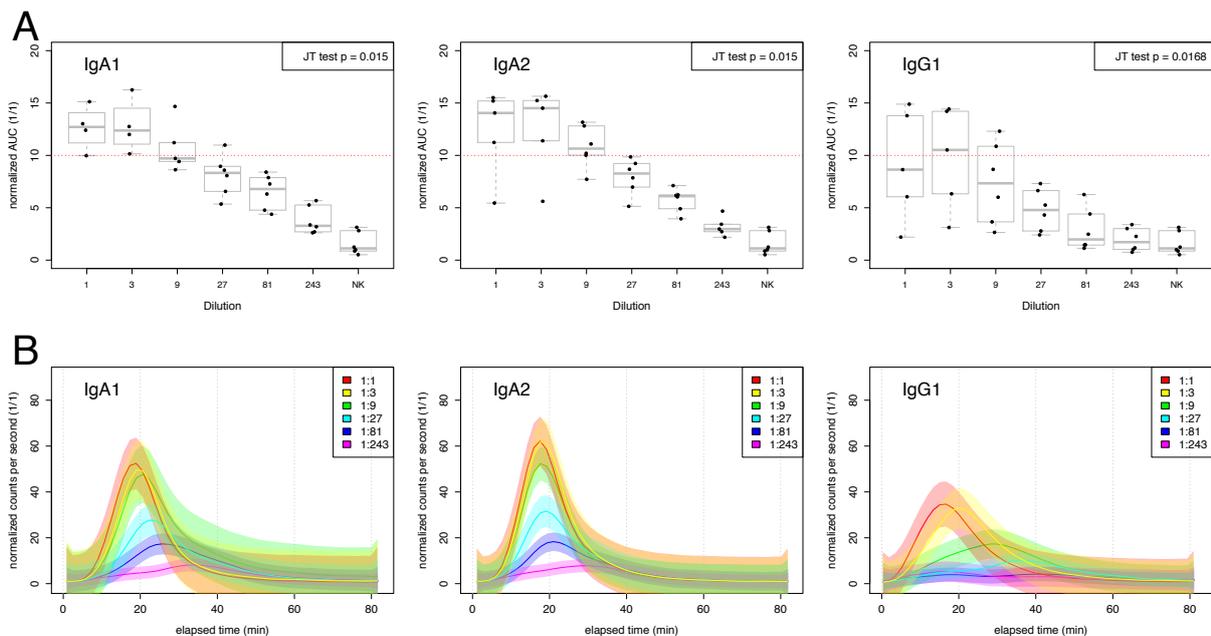


ABBILDUNG 3.3 – ROS-Release von neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit immobilisierten Autoimmunkomplexen. Rekombinante Autoantikörper induzieren die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Eine Microtiterplatte wurde mit hCol7EF-Antigen beschichtet und mit den rekombinanten Autoantikörpern der IgA1- bzw. IgA2-Subklassen sowie mit dem IgG1-Isotyp inkubiert. Nach Zugabe von frischen isolierten humanen neutrophilen Granulozyten gesunder Spender wurde die mit Luminol verstärkte Chemilumineszenz in Form einer Kinetik aufgezeigt. Die Kinetiken separater Experimente wurden zur Area under curve (AUC) zusammengefasst und für die einzelnen Spender auf die Zellkontrolle ohne Stimulation normalisiert. **A**, Dargestellt sind die AUC Werte für IgA1, IgA2 und IgG1 in einem gemischten Box-Whisker/Scatter-Plot, wobei jeder Datenpunkt einem Experiment entspricht. Diese zeigen eine Dosisabhängigkeit des ROS-Release, abhängig von der eingesetzten Konzentration der rekombinanten Autoantikörper. Sowohl für IgA1 (adjustierter Jonckheere-Terpstra-Test, p Value= 0.015) und für IgA2 (adjustierter Jonckheere-Terpstra-Test, p Value= 0.015) als auch für IgG1 (adjustierter Jonckheere-Terpstra-Test, p Value= 0.0168) konnte eine eindeutige Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden. **B**, Zusammengefasste Darstellung der Kinetiken von IgA1, IgA2 und IgG1 bei den unterschiedlichen Konzentrationen von 1:1 bis 1:243. Die Zusammenfassung erfolgte anhand der auf die Zellkontrolle normalisierten Kinetikdaten mittels einer Splinefunktion. Dargestellt sind die Kurven der jeweiligen Splines inklusive der 95% Konfidenzbänder (gleichfarbiger schattierter Bereich).

3.4 Induktion einer dermo-epidermalen Separation mit Seren von EBA-Patienten mit IgA-Reaktivität gegen humanes Kollagen Typ VII im *ex vivo* Modell blasenbildender Dermatosen

Autoantikörper gegen humanes Kollagen Typ VII vom IgG-Typ können durch Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten eine Spaltbildung an der Dermis induzieren (Shimanovich *et al.* , 2004). Dafür gibt es gute Belege, sowohl für rekombinante als auch für solche Autoantikörper, die in den Seren von Patienten mit Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) und bullösem systemischem Lupus erythematoses (BSLE) nachgewiesen werden (JE *et al.* , 2006; Recke *et al.* , 2010; Sitaru *et al.* , 2002b). Dagegen ist bisher nur wenig darüber bekannt, ob Autoantikörper vom IgA-Typ die Spaltbildung genauso induzieren (van der Steen *et al.* , 2012). 2012 zeigte die Arbeitsgruppe von van der Steen, dass Seren von IgA-abhängigen Autoimmundermatosen in einem *ex vivo* Modell eine Granulozyten-Migration und eine dermo-epidermale Separation induzieren (van der Steen *et al.* , 2012). Jedoch wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, ob nicht auch zusätzlich IgG-Autoantikörper hierfür verantwortlich sein könnten. Außerdem wurden keine EBA-Seren getestet.

Daher untersuchte ich in dieser Arbeit die Fähigkeit der Seren von EBA-Patienten, welche IgA beinhalten, aber keinerlei Aktivität von IgG gegenüber Kollagen Typ VII aufweisen, in einem *ex vivo* Krankheitsmodell eine dermo-epidermale Separation zu induzieren. Dieser *ex vivo* Versuch wurde von der Arbeitsgruppe entwickelt und ist eine etablierte Methode zum Nachweis der Induktion einer dermo-epidermalen Spaltbildung (DES) (Sitaru *et al.* , 2002b). Die verwendeten Patientenserum wurden uns freundlicherweise von Marcel Jonkman zur Verfügung gestellt (University of Groningen, University Medical Center Groningen, Department of Dermatology, The Netherlands). Die Seren wurden im Vorfeld wie beschrieben (2.3) auf Ihre Bindungseigenschaften gegenüber humanem Typ VII Kollagen untersucht. Für das *ex vivo* Krankheitsmodell wurden Gefrierschnitte humaner neonataler Vorhaut mit Seren von IgA-EBA-Patienten sowie zum Vergleich mit Seren von IgG-EBA-Patienten und als Positivkontrolle Seren von BP-Patienten mit Verdünnungen von 1:5 und 1:10 inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Serum von gesunden Spendern (NHS) verwendet. Die Gefrierschnitte wurden im Anschluss für 2,5 Stunden mit einer Schicht frisch isolierter Leukozyten gesunder Spender bedeckt. Zum Entfernen der Leukozyten wurden die Schnitte gewaschen und anschließend mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Die dermo-epidermale Spaltbildung (DES)

wurde verblindet mikroskopisch beurteilt. Hierbei wurde die Länge der Spaltbildung zur totalen Länge der DEJ in Relation gesetzt. Dieses Experiment wurde mindestens dreimal pro Patientenserum mit Leukozytenpräparationen von gesunden, jeweils verschiedenen Spendern wiederholt. Um eine gute Qualität der Daten sicherzustellen, wurden für die folgenden Analysen lediglich Experimente verwendet, in denen die Positivkontrolle mit den BP-Patienten-Seren mehr als 50% DES induzierte. Die Seren von zwei verschiedenen IgA-EBA-Patienten führten im Vergleich zu der Negativkontrolle mit NHS zu einer signifikanten Spaltbildung zwischen 20% DES und einer kompletten Ablösung der Epidermis von der Dermis. Das Ausmaß der durch die Patientenseren induzierten Spaltbildung gegenüber der Negativkontrolle mit NHS wurde dabei mittels einseitigem Wilcoxon Test und der Bonferroni-Holm-Korrektur für multiple Paare ausgewertet: IgA-EBA1, Median DES 25% (Q25: 20%, Q75: 65%, $p < 0.001$), und IgA-EBA2, Median DES 60% (Q25: 35%, Q75: 85%, $p < 0.001$). Die Spaltbildung, induziert durch IgG-EBA-Seren ($p < 0.001$) und durch die Positivkontrollen mit BP-Seren ($p < 0.001$), ist ähnlich stark ausgeprägt (Abb. 3.4).

3.5 Bestimmung der optimalen Konzentrationen der rekombinanten Autoantikörper mittels indirekter Immunfluoreszenz vor Einsatz im Gefrierschnitt-Modell

Um sicherzustellen, dass der optimale Konzentrations-Dosisbereich der rekombinanten Autoantikörper im Gefrierschnitt-Modell 3.4 ausgenutzt wird, wurde dieser mittels indirekter Immunfluoreszenz ermittelt. Hierfür wurden Gefrierschnitte neonataler Vorhaut mit den rekombinanten Autoantikörpern der Subklassen IgA1, IgA2 und IgG1 in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Die Autoantikörper wurden zuvor mit Dylight 488 markiert. Die Bindung der rekombinanten Autoantikörper an der DEJ wurde mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie dargestellt und mit ImageJ-Analyse-Software ausgewertet. Dabei wurde die Intensität des Fluoreszenzsignals an der DEJ auf die Intensität des Hintergrund-Signals der unspezifischen Fluoreszenz der Epidermis normalisiert. Eine nicht-lineare Sigmoidfunktion wurde mittels Gnu R ermittelt (Abb. 3.5). Dargestellt sind die Datenpunkte sowie die Regressionskurve. Hierdurch konnte der Konzentrations-Dosisbereich mit einer Sättigung zwischen 5% und 95% ermittelt werden. Die Bestimmung dieses Dosisbereichs ist wichtig, damit die einzelnen rekombi-

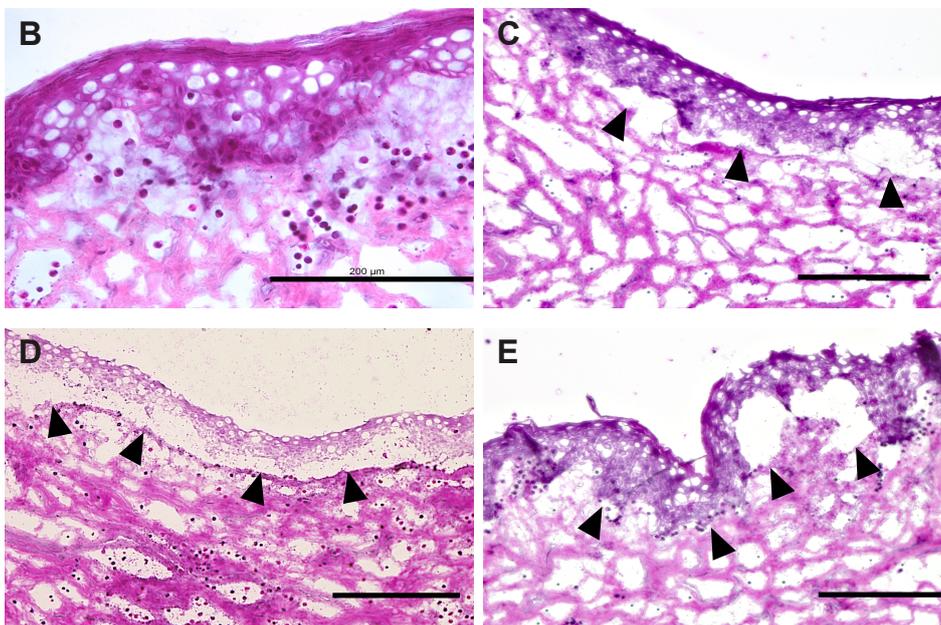
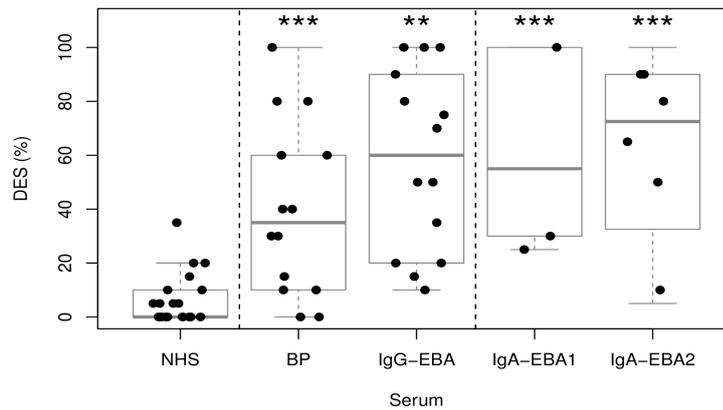
A

ABBILDUNG 3.4 – Ex-vivo-Modell der leukozytenabhängigen dermo-epidermalen Spaltbildung. Kryoschnitte von menschlicher neonataler Vorhaut wurden mit Normalserum (**A**: NHS) als Negativkontrolle, Serum eines Patienten mit BP (**A**: BP) sowie mit IgG-Variante der EBA (**A**: IgG-EBA) inkubiert. Im Vergleich dazu wurden Seren von zwei EBA-Patienten mit ausschließlicher IgA-Autoreaktivität (**A**: IgA-EBA1 und IgA-EBA2) untersucht. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:3 verwendet. Nachfolgend wurden die Kryoschnitte mit frisch isolierten Leukozyten gesunder Spender inkubiert. Die dermo-epidermale Spaltbildung wurde nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung lichtmikroskopisch evaluiert. **A**, graphische Darstellung der dermalen Spaltbildung (DES) in Prozent mittels gemischtem Box-Whisker/Scatter-Plot. Jeder Punkt entspricht einem unabhängigen Experiment. Die statistische Analyse erfolgte mittels Wilcoxon-Rangsummentest, jedes Patientenserum jeweils im Vergleich mit NHS. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. **B**, repräsentative mikroskopische Aufnahme einer Negativkontrolle mit Normalserum. **C**, Positivkontrolle mit einem Serum eines BP-Patienten. **D**, Ergebnis mit einem Serum eines Patienten mit IgG-EBA. **E**, Ergebnis mit einem Serum eines Patienten mit IgA-EBA. Die schwarzen Balken entsprechen jeweils $200 \mu\text{m}$. Die Dreieckspfeile zeigen die dermo-epidermale Separation.

nanten Autoantikörper in vergleichbaren Dosen eingesetzt werden können und der volle Sättigungsbereich ausgenutzt wird.

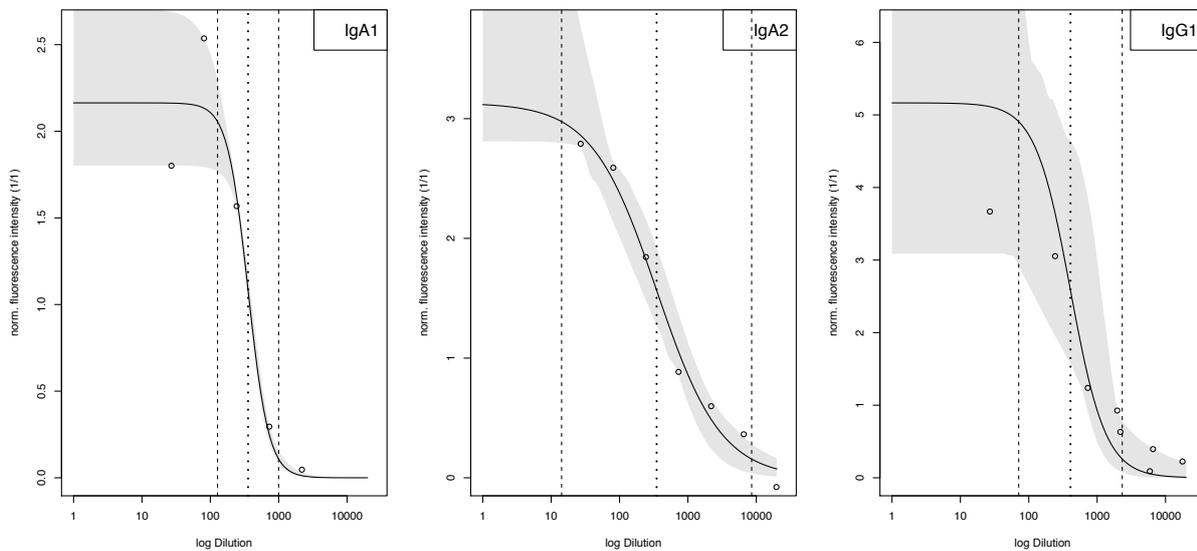


ABBILDUNG 3.5 – Bestimmung der optimalen Konzentrations-Dosen der rekombinanten Autoantikörper mittels indirekter Immunfluoreszenz. Schnitte humaner neonataler Vorhaut wurden mit Dylight 488 markierten rekombinanten IgA1-, IgA2- und IgG1-Autoantikörpern inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und ImageJ analysiert. Die Intensität des Fluoreszenzsignals der DEJ wurde auf das Hintergrund-Signal der Epidermis normalisiert. Dargestellt ist die nicht-lineare Sigmoid-Regressionskurve. Die gepunkteten vertikalen Linien markieren den Wendepunkt der Sigmoidfunktion, die gestrichelten Linien die Konzentrationen zwischen 5% und 95% der Sättigung. Die Punkte stellen das normalisierte Fluoreszenzsignal des jeweiligen Antikörpers (IgA1, IgA2 und IgG1) und der graue Bereich die Streuung der Messwerte um die Sigmoid-Regressionskurve dar .

3.6 Induktion einer dermo-epidermalen Separation durch rekombinante IgA-Autoantikörper im *ex vivo* Modell blasenbildender Dermatosen

Für die Untersuchung der Fähigkeit rekombinanter Autoantikörper vom IgA-Subtyp eine DES zu induzieren, wurde das unter Abschnitt 3.4 auf Seite 39 beschriebene Versuchsmodell verwendet. Die eingesetzten Dosen stellten eine Konzentration der rekombinanten Autoantikörper im Bereich zwischen 5% und 95% der Sättigung sicher (Abb. 3.5). Hierzu wurde mittels Immunfluoreszenz die Bindungsfähigkeit der rekombinanten Autoantikörper an die DEJ ermittelt und die Dosen wie bereits unter Abschnitt 3.5 auf Seite

40 beschrieben bestimmt. Der Versuch wurde mehrfach ($n=20$) mit Leukozytenpräparationen von verschiedenen Spendern ($n=15$) wiederholt. Um eine gute Qualität der Daten sicherzustellen, wurden auch hier für die folgenden Analysen lediglich Experimente verwendet, in denen die Positivkontrolle (BP-Patienten-Seren) mehr als 50% DES induzierte. Zur Bewertung der Dosisabhängigkeit wurden der Jonckheere-Terpstra-Test und die Bonferroni-Holm-Korrektur verwendet. Die rekombinanten Autoantikörper vom IgA-Subtyp induzierten im Median eine DES von über 20% (Intervall von 0% bis 100%) mit einer klaren Dosisabhängigkeit für IgA1 ($p = 0.000998$) und IgA2 ($p = 0.000173$) (Abb. 3.6 B, C und D).

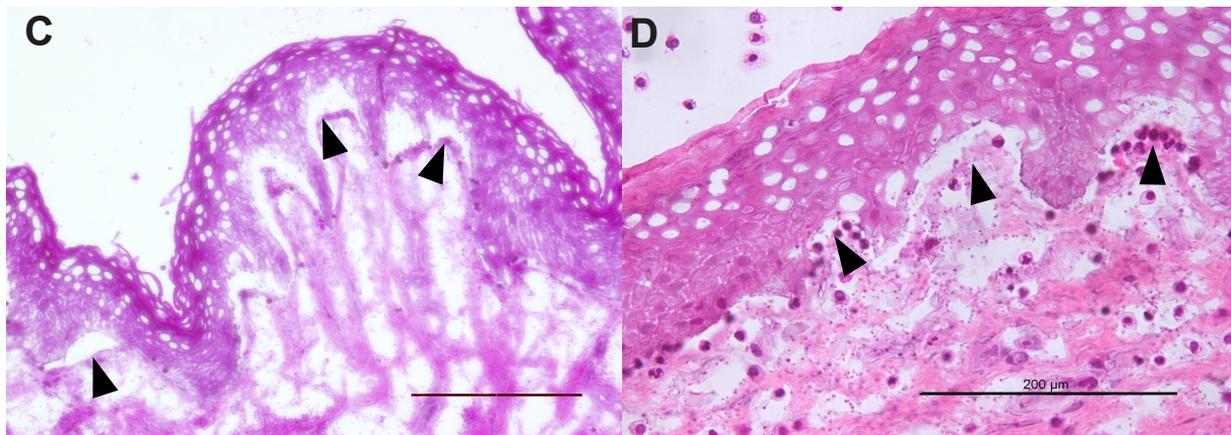
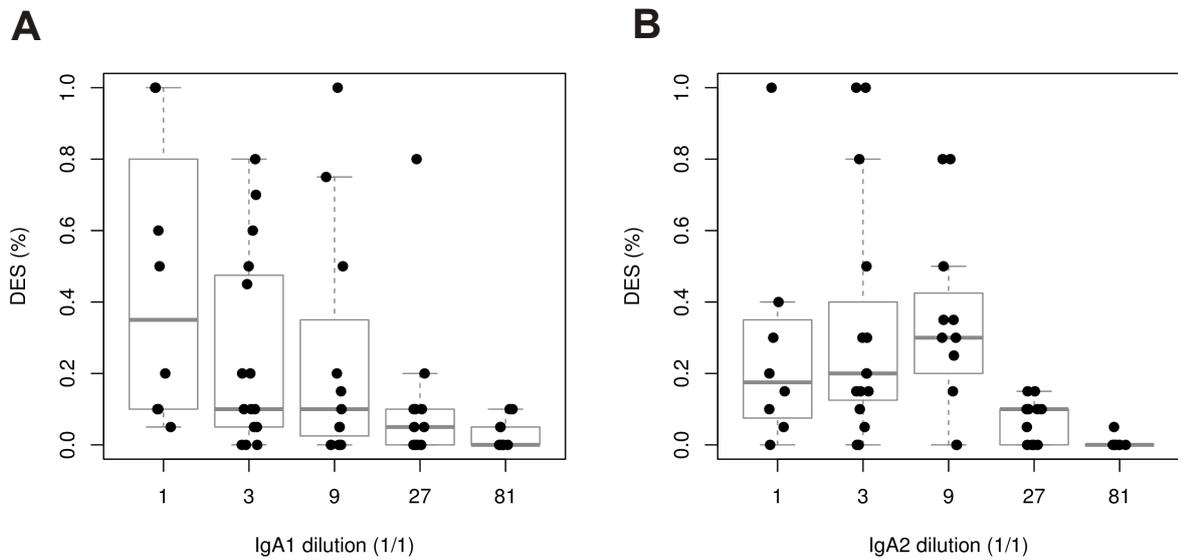


ABBILDUNG 3.6 – Rekombinante IgA1- und IgA2-Antikörper induzierten ex vivo dosisabhängig eine dermo-epidermalen Separation. Rekombinant Autoantikörper der IgA1- und IgA2-Subklassen wurden in verschiedenen Konzentrationen mit Kryoschnitten von Neugeborenenvorhaut inkubiert. Die Konzentrationen der Antikörper wurden anhand einer Titrierung so angepasst, dass sie Bereich zwischen 5% (normierte Verdünnungsstufe 81) und 95% (normierte Verdünnungsstufe 1) der Sättigung aller Bindungsstellen umfassen (siehe Abb. 3.5). Nachfolgend wurden die Kryoschnitte mit frisch isolierten Leukozyten gesunder Spender inkubiert. **A, B**, graphische Darstellung der dermalen Spaltbildung (DES) durch IgA1 (**A**) bzw. IgA2 (**B**) in Prozent mittels gemischtem Box-Whisker/Scatter-Plot. Jeder Punkt entspricht einem unabhängigen Experiment. Mittels Jonckheere-Terpstra-Trend-Test zeigt sich eine signifikante Dosisabhängigkeit der Spaltbildung bei IgA1 ($p < 0.001$) und IgA2 ($p < 0.001$). Darunter gezeigt sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen von Proben mit rekombinantem IgA1 (**C**) und IgA2 (**D**). Die schwarzen Balken entsprechen jeweils 200 μm . Die Dreieckspfeile zeigen die dermo-epidermale Separation.

4 Diskussion

In der Pathogenese subepidermal blasenbildender Autoimmundermatosen wie bullöses Pemphigoid (BP) und Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) spielen Autoantikörper gegen Strukturproteine der Haut eine entscheidende Rolle. Bei der EBA handelt es sich um Autoantikörper gegen Typ VII Kollagen (Woodley *et al.* , 1988), beim BP dagegen sind die Autoantikörper gegen Bestandteile der Hemidesmosomen BP180 (synonym Typ XVII Kollagen) und BP230 gerichtet (Giudice *et al.* , 1992; Stanley *et al.* , 1981). Die EBA präsentiert sich in verschiedenen Subformen (Remington *et al.* , 2008), wobei insbesondere die entzündliche von der mechano-bullösen Form unterschieden wird. Neben dem Befall der Haut treten zudem Varianten mit einer Beteiligung der Schleimhäute auf, die Ähnlichkeiten mit Schleimhautpemphigoid haben (Buijsrogge *et al.* , 2011). Wesentliches Problem bei der Diagnose der EBA ist der nur geringe Titer von zirkulierenden Autoantikörpern, wodurch die molekulare Diagnostik und die Unterscheidung zum bullösen Pemphigoid sehr erschwert wird. Eine Möglichkeit zur Unterscheidung ist die aufwändige Kochsalzbehandlung von Hautbiopsaten, um die Ablagerung der Autoantikörper genauer zu differenzieren. Eine weitere, kürzlich beschriebene Methode ist die Unterscheidung von n-Riffelung (*n-serrated pattern*) und u-Riffelung (*u-serrated pattern*) in extradünnen Kryoschnitten von Hautbiopsaten (Terra *et al.* , 2013). Im Wesentlichen wird beschrieben, dass die Autoantikörper vom IgG-Typ am häufigsten vorkommen, jedoch auch IgA vorliegen kann (Delgado *et al.* , 2011). In einer Population mit unseren Kooperationspartnern, die uns auch diverse Seren von Patienten mit IgA-EBA für experimentelle Untersuchungen zur Verfügung gestellt haben, wird knapp bei der Hälfte der Patienten eine IgA-Reaktivität gegen Typ VII Kollagen gefunden, meist gemischt mit IgG. In einem Drittel der Patienten liegt eine ausschließliche IgA-Reaktivität vor (Buijsrogge *et al.* , 2011). Im Vergleich dazu findet sich beim BP in 25% der Fälle eine IgA-Reaktivität gegen Typ XVII Kollagen (Csorba *et al.* , 2011).

4.1 Krankheitsrelevanz der Autoantikörper subepidermal blasenbildender Autoimmundermatosen

Bei BP und EBA wurde die Pathogenität von IgG-Autoantikörpern wiederholt und in unabhängigen Modellen nachgewiesen (Ludwig *et al.* , 2013; Schmidt & Zillikens, 2013). Im einzelnen wurde für BP und EBA gezeigt, dass

1. die Titerhöhe der zirkulierenden Autoantikörper mit der Krankheitsaktivität bei Patienten korreliert
 - beim bullösen Pemphigoid (Döpp *et al.* , 2000; Feng *et al.* , 2008; Mutasim, 2000; Schmidt *et al.* , 2000c; Sitaru *et al.* , 2005)
 - bei der Epidermolysis bullosa acquisita (Kim *et al.* , 2013; Lee *et al.* , 2012; Saleh *et al.* , 2011)
2. Immununkomplexe mit anti-Typ-VII-Kollagen- bzw. anti-Typ-XVII- Kollagen-Autoantikörpern *in-vitro* neutrophile Granulozyten aktivieren (Jordon *et al.* , 1985; Yu *et al.* , 2010; Zhao *et al.* , 2006)
3. anti-Typ-VII-Kollagen- bzw. anti-Typ-XVII-Kollagen-Autoantikörper *ex-vivo* nach Zugabe neutrophiler Granulozyten eine dermo-epidermale Spaltbildung induzieren (Recke *et al.* , 2010; Shimanovich *et al.* , 2004; Sitaru *et al.* , 2002a,b)
4. der Autoantikörpertransfer in Mäusen ein experimentelles BP/EBA induziert (Csorba *et al.* , 2012; Liu *et al.* , 1993; Sitaru *et al.* , 2005)
5. Immunisierung mit rekombinanten Fragmenten des Typ VII bzw. Typ XVII Kollagens in suszeptiblen Mausstämmen eine der menschlichen Erkrankung entsprechende Symptomatik induziert (Hirose *et al.* , 2011; Sitaru *et al.* , 2006)

Die Schlüsselrolle der Autoantikörper in der Pathogenese blasenbildender Autoimmundermatosen hat eine wesentliche Bedeutung für die Diagnostik und die Therapie dieser Erkrankungen. Durch den Nachweis der Autoantikörper im Serum steht ein direkter Surrogatparameter für die Krankheitsaktivität zur Verfügung, welcher für Verlaufskontrollen und die Durchführung der Therapie von Bedeutung ist. Dieses ist insbesondere wichtig, weil der Nachweis von zirkulierenden Autoantikörpern auch bei klinisch inapparenten Fällen ein Hinweis auf einen noch bestehenden Therapiebedarf oder die Gefahr eines Rezidivs anzeigen kann.

Des weiteren gibt es Ansätze, die krankmachenden Autoantikörper aus dem Serum durch spezielle Aphereseverfahren zu entfernen, um auf diese Weise diese Erkan-

kungen gezielt zu behandeln. Bisher ist es allerdings erst möglich, insbesondere die IgG-Fraktion im Rahmen einer (Protein-A) Immunadsorption zu entfernen, was jedoch nur unspezifisch auf die Autoantikörpertiter wirkt (Eming & Hertl, 2006; Recke *et al.* , 2011; Schmidt & Zillikens, 2010; Schmidt *et al.* , 2003). Spezifisch auf Autoantikörper zielende Verfahren befinden sich in der Entwicklung.

Im Falle von IgA-Autoantikörpern bei subepidermal blasenbildenden Dermatosen wurde die Pathogenität bisher nur indirekt nachgewiesen (van der Steen *et al.* , 2012). Dieses mag mit der Schwierigkeit zusammenhängen, IgA-Autoantikörper in genügender Menge und Reinheit, insbesondere ohne Kontamination mit IgG-Autoantikörpern, aus Patientenseren aufzureinigen und zu untersuchen. Erst seit kurzem steht mit Peptid M-Agarose eine kommerziell verfügbare Matrix zur einfachen Affinitätsaufreinigung von IgA1 und IgA2 zur Verfügung, welche ein IgA-bindendes Protein von *Streptococcus species* verwendet (Sandin *et al.* , 2002). Zur Entwicklung von diagnostischen und therapeutischen Verfahren bei IgA-vermittelten Autoimmundermatosen ist es grundlegend, die pathogenetische Wirkung von IgA-Autoantikörpern nachzuweisen.

4.2 Pathogenität von IgG-Autoantikörpern gegen Typ VII und Typ XVII Kollagen

Werden Immunkomplexe (IC) durch Inkubation von IgG-Autoantikörper mit den entsprechenden Antigenen in 96-well Platten generiert, führt hier die Zugabe neutrophiler Granulozyten zu deren Aktivierung. Neben dem Nachweis von ROS ist der Nachweis von Elastase im Überstand möglich, welches die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten weiter dokumentiert (Kulkarni *et al.* , 2011; Yu *et al.* , 2010).

Bereits vor diesem *in-vitro* Nachweis konnte *ex-vivo* das blasenbildende Potential von sowohl anti-Typ-XVII-Kollagen (Sitaru *et al.* , 2002a) als auch anti-Typ-VII-Kollagen-IgG (Sitaru *et al.* , 2002b) nachgewiesen werden. Hier wurden Gefrierschnitte humaner Haut mit Serum, mit aus Serum aufgereinigtem IgG, mit an spezifisch an Autoantigenen affinitätsaufgereinigtem IgG oder mit monoklonalen Antikörpern (Recke *et al.* , 2010) in Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten inkubiert. Dies führte zur dermo-epidermalen Spaltbildung, welche die Blasenbildung bei den Patienten widerspiegelt. Die Induktion dieser dermo-epidermalen Spaltbildung war sowohl von der Bildung von ROS (Chiriac *et al.* , 2007) als auch von proteolytischen Enzymen (Shimanovich *et al.* , 2004) abhängig. Eine differentielle Untersuchung verschiedener Isotypen von anti-Typ-VII-Kollagen-IgG-Antikörpern zeigte, dass bestimmte Isotypen (IgG1 und 3) in der La-

ge sind, die dermo-epidermale Spaltbildung zu induzieren, während andere Isotypen (IgG2 und 4) dieses Potential trotz Bindung an die dermo-epidermale Junctionszone nicht aufweisen (Recke *et al.* , 2010).

Die *in-vivo* Pathogenität von Antikörpern gegen Typ XVII Kollagen konnte bereits vor zwanzig Jahren (1993) nachgewiesen werden. Liu und Kollegen generierten Kaninchen anti-Typ-XVII-Kollagen-Antikörper, welche nach Injektion in neonatale Mäuse innerhalb von 24-48 Stunden eine subepidermale Blasenbildung induzieren (Liu *et al.* , 1993). In Folge wurde dieses Modell zur Aufklärung der Pathogenese des bullösen Pemphigoids verwendet (Heimbach *et al.* , 2009; Leighty *et al.* , 2007; Liu, 2004). Des Weiteren gelang der Nachweis der Pathogenität von IgG-Antikörpern gegen Typ XVII Kollagen, welche aus Patientenseren isoliert wurden, in transgenen Mäusen. Bei diesen Mäusen wurde das murine Gen des Typ XVII Kollagen ausgeschaltet und durch das menschliche Gen ersetzt (COL17-humanisierte Mäuse). Nach Injektion von IgG aus Seren von BP-Patienten konnte in diesen Tieren ein experimentelles bullöses Pemphigoid hervorgerufen werden (Nishie *et al.* , 2007; Ujiie *et al.* , 2010). Darüber hinaus sind Lymphozyten-Transfer-Modelle des BP entwickelt worden (Ujiie *et al.* , 2012), bei denen Milzzellen von Mäusen nach Immunisierung mit menschlichen Typ XVII Kollagen in COL17-humanisierte Mäuse übertragen wurden und auf diese Weise zur Erkrankung führten. Ein aktives Mausmodell in ausgewachsenen Tieren wurde erst vor kurzem entwickelt. Dabei wurde die Immuntoleranz in suszeptiblen Mausstämmen durch Immunisierung mit Fragmenten des Typ XVII Kollagens in Kombination mit einem besonderen Adjuvans (Titermax) durchbrochen. Nach mehrmaliger Immunisierung mit Fragmenten des Typ XVII Kollagen entwickelten die Mäuse zirkulierendes und gewebsgebundenes anti-Typ-XVII-Kollagen-IgG. Es konnte eine Komplementablagerung an der dermo-epidermalen Junctionszone gezeigt werden und ca. 50% der Tiere entwickelten eine klinisch manifeste subepidermale Autoimmundermatose, die dem humanen BP entspricht (Hirose *et al.* , 2011).

Die *in-vivo* Pathogenität der IgG-Autoantikörper gegen Typ VII Kollagen wurde 2005 von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen erbracht. Hierbei wurde ein passives Transfermodell verwendet, bei dem IgG-Antikörper aus immunisierten Kaninchen in Mäuse injiziert wurden. Injektion von Kaninchen-IgG gegen murines (Sitaru *et al.* , 2005) bzw. humanes (Woodley *et al.* , 2005) Typ VII Kollagen rief in Mäusen eine der menschlichen Erkrankung entsprechende subepidermal blasenbildende Autoimmundermatose hervor. Diese passiven Transfermodelle wurden weiterentwickelt, charakterisiert und teilweise modifiziert. Eine experimentelle EBA läßt sich in verschiedenen Ein- und Auszuchtmauslinien durch den Transfer von

1. humanen IgG-Antikörpern aus EBA-Patienten in SKH-1 Mäuse (Woodley *et al.* , 2006)
2. gegen die CMP-Domäne (*Cartilage Matrix Protein*) aufgereinigte humane IgG in SKH-1 Mäuse (Chen *et al.* , 2007)
3. Kaninchen-anti-Maus-vWFA2-IgG-Antikörpern in verschiedene Auszuchtstämme (Iwata und Vorobyev, Arbeitsgruppe Autoimmunität, im Druck)
4. Kaninchen-anti-Mensch-Typ-VII-Kollagen-Antikörper in COL7-humanisierte Mäuse (COL7 m^{-/-},h⁺) (Vorobyev, Arbeitsgruppe Autoimmunität, mündliche Mitteilung)

hervorrufen.

Neben diesem *passiven Transfer* von IgG kann eine experimentelle EBA in Mäusen auch durch *aktive* Immunisierung mit verschiedenen Antigenen, die innerhalb der im-mundominanten NC1-Domäne des Typ VII Kollagen lokalisiert sind, induziert werden. Hier wurden Protokolle mit mehrmaliger (Sitaru *et al.* , 2006) und einmaliger Immunisierung (Ludwig *et al.* , 2011) beschrieben. Nach Immunisierung entwickeln die meisten Inzuchtmausstämme zirkulierende und gewebsgebundene IgG-Autoantikörper gegen murines Typ VII Kollagen. Jedoch nur sehr wenige Stämme entwickeln eine klinisch manifeste subepidermale blasenbildende Autoimmundermatose, die der menschlichen EBA entspricht (Ludwig *et al.* , 2013). Unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe zeigen, dass in einem der Immunisierungs-induzierten EBA-Mausmodelle auch IgA-Antikörper gebildet werden; Typ VII Kollagen spezifische IgE-Autoantikörper wurden in diesem Modell nicht nachgewiesen. Allerdings reicht der alleinige Transfer von IgG erkrankter Tiere aus, um in gesunden Tieren eine EBA zu induzieren (Sitaru *et al.* , 2006). Daher ist die Pathogenität der IgG-Autoantikörper gegen Typ VII Kollagen klar belegt, während die Pathogenität von IgA-Autoantikörpern bei diesen Erkrankungen bisher noch unklar ist.

4.3 Pathogenität von IgA-Autoantikörpern

Es gibt verschiedene chronisch-entzündliche Krankheiten, in denen die Pathogenität von IgA-Antikörpern bereits belegt wurde: Hierzu gehören Zöliakie, IgA-Nephropathie, Purpura-Schönlein-Hennoch, IgA-Pemphigus, Dermatitis herpetiformis Dühring und die lineare IgA-Dermatose (Brandtzaeg, 2010; Ebert, 2008; Mihai & Sitaru, 2007; Monteiro, 2007; Zone *et al.* , 2004). In diesen Erkrankungen wurden Ablagerungen von Immunkomplexen, welche aus IgA-Antikörpern und Antigen bestehen, nachgewiesen. Die Pathogenität von IgA-Immunkomplexen soll hier beispielhaft anhand der IgA-Nephropathie beschrieben werden (Suzuki *et al.* , 2011). Bei dieser Erkrankung findet sich vermehrt

ein erhöhter Spiegel von zirkulierenden IgA-Antikörpern mit Galaktose-defizientem O-Glykan in der *Hinge*-Region (Berthoux *et al.* , 2012). Gegen diese Galaktose-defizienten IgA-Antikörper werden aus bisher nicht geklärten Gründen Antikörper entwickelt und es entstehen IgA-Autoimmunkomplexe. Die Ablagerung dieser Immunkomplexe im glomerulären Mesangium induziert eine Aktivierung der Mesangiumzellen. Daraus resultiert u.a. die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, welche durch ihre entzündungsfördernde Wirkung eine Zerstörung der Niere induzieren (Novak *et al.* , 2013). Für die Pathogenese der IgA-Nephropathie sind die IgA-Antikörper somit nicht allein ausreichend.

Die Pathogenität von IgA-Autoantikörpern gegenüber der dermo-epidermalen Junctionszone der Haut ist bisher nicht detailliert untersucht worden. Jedoch weisen klinische Beobachtungen auf eine potentielle Pathogenität von IgA-Autoantikörpern gegen Strukturproteine der Haut hin: Bei vielen blasenbildenden Autoimmundermatosen lassen sich IgA-Autoantikörper gegen Strukturproteine der Haut nachweisen (siehe Tabelle 1.1 auf Seite 8). Zum Beispiel bei der EBA liessen sich in einer retrospektiven Studie von Kim *et al.* (2011) bei rund 80% der Patienten IgG-Autoantikörper nachweisen, bei über einem Drittel der Patienten IgG und IgA. Beim bullösen Pemphigoid lässt sich bei der überwiegenden Zahl der Patienten in Biopsien eine Ablagerung von IgG nachweisen, gelegentlich ist diese jedoch auch mit einer schwachen linearen Ablagerung von IgA und IgE assoziiert. In einer Studie von Kromminga *et al.* (2000) mit 40 Patienten ließen sich im Serum bei 98% der Patienten IgG-Autoantikörper gegen Typ XVII Kollagen nachweisen. Zusätzlich konnten aber bei 88% der Patienten auch IgA-Autoantikörper gegen Typ XVII Kollagen nachgewiesen werden. Beim Schleimhautpemphigoid lassen sich entweder IgG- oder IgA-Antikörperablagerungen an der dermo-epidermalen Junctionszone nachweisen (España *et al.* , 2005). Im Serum konnten sogar bei über 60% der Patienten IgA-Autoantikörper nachgewiesen werden (Oyama *et al.* , 2006; Schmidt *et al.* , 2001).

In einigen Fällen lassen sich auch überwiegend oder ausschließlich IgA-Autoantikörper nachweisen. Zu diesen Erkrankungen zählen der IgA-Pemphigus (Tsuruta *et al.* , 2011), die Dermatitis herpetiformis Duhring (Nakajima, 2012) und auch die IgA-EBA (Vodegel *et al.* , 2002). Bei einigen blasenbildenden Autoimmundermatosen sind IgA-Autoantikörper namensgebend, wie bei der linearen IgA-Dermatose (LAD). Allerdings wird trotz des Namens nur in wenigen Fällen IgA allein nachgewiesen. Bei der überwiegenden Zahl der Fälle der Patienten lässt sich auch eine IgG-Reaktivität gegen Typ XVII Kollagen nachweisen. In einer Studie mit 40 Patienten ließen sich bei 68% IgA- und bei 76% IgG-Autoantikörper gegen Typ XVII Kollagen nachweisen (Kromminga *et al.* , 2000). Ins-

besondere die Manifestation blasenbildender Autoimmundermatosen ohne Nachweis einer IgG-Reaktivität gegen Strukturproteine der Haut deutet darauf hin, dass IgA-Autoantikörper in der Lage sind *in-vivo* Blasen zu induzieren.

Diese Annahme wurde kürzlich experimentell weiter untermauert: van der Steen und Kollegen konnten nachweisen, dass (1) in Kryoschnitten von LAD-Patienten $Fc\alpha RI$ -positive Granulozyten im dermale Infiltrat mit IgA-Antikörpern kolokalisiert sind, (2) diese Granulozyten zu IgA-Ablagerungen migrieren und (3) Serum von LAD-Patienten *ex-vivo* in der Lage ist, eine dermo-epidermale Spaltbildung zu induzieren. Diese Spaltbildung wurde komplett durch Zugabe von gegen $Fc\alpha$ -Rezeptor I gerichtete MIP8a-Antikörper blockiert (van der Steen *et al.* , 2012). Diese Daten weisen auch auf eine potentielle Pathogenität der IgA-Autoantikörper hin. Allerdings sind diese Daten nicht beweisend, da wie erwähnt in 76% der LAD-Patienten auch IgG gegen Typ XVII Kollagen nachgewiesen wird und die Spaltbildung daher auch durch IgG vermittelt worden sein könnte. Weiterhin wäre es möglich, dass die Bindung des MIP8a-Antikörpers indirekt die Aktivierung der Neutrophilen durch IgG-Immunkomplexe bewirkt (Zhang *et al.* , 2000). Daher weisen diese Untersuchungen auf eine potentielle pathogene Rolle der IgA-Autoantikörper bei blasenbildenden Autoimmundermatosen hin, sind jedoch nicht in letzter Konsequenz beweisend.

4.4 Pathogenetische Wirkung rekombinanter IgA-Autoantikörper gegen Typ VII Kollagen

In der Arbeitsgruppe konnten kürzlich rekombinante IgG-Autoantikörper gegen humanes Typ VII Kollagen hergestellt werden. Dabei wurden variable Domänen, die gegen das menschliche Typ VII Kollagen gerichtet sind, mittels *Phage-display* aus immunisierten Mäusen selektiert. Durch rekombinante Fusion mit schweren und leichten konstanten Domänen menschlicher Immunglobuline wurden komplette Antikörper erzeugt, welche sich zwar in ihren Isotypen, nicht jedoch in ihren Idiotypen unterscheiden (Recke *et al.* , 2010). Mit Hilfe dieser Autoantikörper konnte erstmals die *in-vitro*- und *ex-vivo*-Pathogenität der verschiedenen IgG-Subklassen sehr präzise charakterisiert werden. Für diese Arbeit wurden Konstrukte verwendet, bei denen die variablen Domänen an menschliche konstante Domänen von IgA1 und IgA2 geflanscht wurden. Somit standen für diese Arbeit hochreine IgA-Autoantikörper mit definierter Spezifität und ohne Beimischung anderer Isotypen zur Verfügung.

Unter Verwendung dieser rekombinanten IgA-Autoantikörper gegen humanes Typ VII Kollagen konnte ich in dieser Arbeit zeigen, dass

1. die rekombinanten IgA-Autoantikörper an natives Kollagen Typ VII in der indirekten Immunfluoreszenz binden
2. rekombinante IgA-Autoantikörper im Immunoblot mit humanen dermalen Extrakten an 290 kDa große, dem Kollagen Typ VII entsprechende, Proteine binden
3. rekombinante Autoantikörper IgA1 und IgA2 im indirekten Komplementbindungstest unfähig sind, eine C3b Ablagerung an der dermo-epidermalen Junktionszone zu induzieren
4. Autoimmunkomplexe aus IgA1- und IgA2-Autoantikörpern die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies aus neutrophilen Granulozyten induzieren
5. die Menge der ROS-Produktion dabei positiv mit der IgA1- und IgA2-Antikörperkonzentration korreliert
6. Seren von Patienten mit IgA-EBA eine Leukozyten-abhängige Spaltbildung an der dermo-epidermalen Junktionszone induzieren
7. rekombinante IgA-Autoantikörper ebenso eine Leukozyten-abhängige Spaltbildung induzieren, bei welcher das Ausmaß positiv mit der IgA-Autoantikörperkonzentration korreliert.

Auf die Bedeutung der einzelnen Befunde soll im Folgenden im Detail eingegangen werden.

Rekombinante IgA1- und IgA2-Autoantikörper binden Typ VII Kollagen in Kryoschnitten und Proteinextrakten menschlicher Haut

Für den Nachweis von zirkulierenden Autoantikörpern werden im Routinelabor im Wesentlichen die Reaktivität in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie sowie auf Westernblots dermalen Extrakte verwendet. Nach Inkubation der Substrate mit Patientenserum erfolgt der Nachweis von IgG- und IgA-Reaktivität durch nachfolgende Inkubation mit anti-human-IgG und anti-human-IgA-Antikörpern. Um die Vergleichbarkeit der rekombinanten IgA-Autoantikörper mit Autoantikörpern von EBA-Patienten zu demonstrieren, wurde ihre Reaktivität auf Kryoschnitten menschlicher Neugeborenenhaut in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie sowie mit einer 290 kDa-Bande auf Westernblots von Extrakten menschlicher Haut (dermalen Extrakten) untersucht. Hierbei zeigte sich eine Reaktivität, wie sie auch bei Seren von Patienten mit IgA zu erwarten ist.

Die Bindung der Autoantikörper an Typ VII Kollagen und somit die Ausbildung von immobilisierten Immunkomplexen stellt den ersten Schritt der Autoantikörper-induzierten Gewebeschädigung bei EBA, BP und anderen subepidermalen blasenbildenden Autoimmundermatosen dar (Ludwig *et al.* , 2013). Nach der Bildung der anti-Typ2-VII-Kollagen-Autoantikörper binden diese relativ rasch ihr vorwiegend in der Haut gebundenes Autoantigen. Im Autoantikörpertransfer-Modell der EBA lassen sich IgG- Antikörper bereits 24 Stunden nach ihrer s.c. Applikation an anderen Stellen der Haut mittels direkter Immunfluoreszenzmikroskopie nachweisen (Ishii *et al.* , 2011). Unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe zeigen, dass anti-Typ-VII-Kollagen-IgG innerhalb von wenigen Minuten in der Haut nachweisbar sind. Im neonatalen Mausmodell sind die subkutan injizierten Antikörper zudem noch nach 24 Stunden nach ihrer Applikation als lineare Ablagerung entlang der DEJ nachweisbar (Liu, 2004; Woodley *et al.* , 2005). Die pathogenetische Wirkung dieser Immunkomplexe in der Haut ist bisher völlig unbekannt.

Bei anderen Autoantikörper-vermittelten Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, konnte gezeigt werden, dass zirkulierende Immunkomplexe die vaskuläre Permeabilität am Zielorgan (Gelenk) erhöhen und somit zur Pathogenese der Erkrankung beitragen (Binstadt *et al.* , 2006). Es ist anzunehmen, dass im Falle löslicher Autoantigene ein ähnlicher Pathomechanismus bei blasenbildenden Autoimmundermatosen vorliegt. Für Typ XVII Kollagen ist eine lösliche Ektodomäne bekannt (Nishie *et al.* , 2011), für welche eine ähnlich geartete Ausbildung von zirkulierenden IgA-Immunkomplexen denkbar ist. Im Falle von Typ VII Kollagen ist bekannt, dass dieses Protein vor seiner Organisation in Ankerfibrillen in einer löslichen Form existiert. Topisch angewendetes lösliches Typ VII Kollagen fügte sich problemlos in die Ankerfibrillen der epidermalen Basalmembran ein (Wang *et al.* , 2013). Es ist sogar möglich, dieses Protein intravenös zu injizieren, um Patienten mit rezessiver dystrophischer Epidermolysis bullosa (RDEB) zu behandeln (Konferenzmitteilung David Woodley). Es ist jedoch nicht bekannt, ob zirkulierende Immunkomplexe mit Typ VII Kollagen bei Patienten mit EBA ausgebildet werden.

Rekombinante IgA1- und IgA2-Autoantikörper sind nicht in der Lage, eine Komplementaktivierung an der dermo-epidermalen Junktionszone zu bewirken

Ein typischer Befund bei blasenbildenden Autoimmundermatosen ist die Ablagerung von Komplementfaktor C3 an der dermo-epidermalen Junktionszone. In einigen Erkrankungen wie dem Pemphigoid gestationis kann der Nachweis von IgG-Ablagerungen an der dermo-epidermalen Junktionszone völlig fehlen, so dass C3-Ablagerung dann oftmals

der einzige Hinweis auf das Vorliegen dieser blasenbildenden Autoimmundermatose ist. Bei der EBA findet sich ebenfalls oft eine Ablagerung von Komplementfaktor C3, wobei diese aber auch fehlen kann. C3-Ablagerungen finden sich auch im Falle einer ausschließlichen IgA-Reaktivität (Buijsrogge *et al.* , 2005), obwohl IgA ein ausgesprochen schlechter Aktivator von Komplement ist (Bogers *et al.* , 1991; Daha *et al.* , 2011). In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen konnte demonstriert werden, dass IgA1 und IgA2 zwar an die dermo-epidermale Junktionszone binden, aber selbst bei Konzentrationen, die alle Bindungsstellen absättigen, keine Ablagerung von Komplement hervorrufen können. Dieses spricht dafür, dass bei Varianten der IgA-EBA, bei denen zusätzlich Komplementablagerungen an der dermo-epidermalen Junktionszone gefunden werden, auch eine Autoreaktivität von IgG vorhanden ist. Diese ist möglicherweise jedoch so gering, dass sie auf direktem Wege nicht nachweisbar ist.

Die fehlende Fähigkeit von IgA-Autoantikörpern, Komplement zu aktivieren, hat Konsequenzen für das Pathogenesemodell IgA-vermittelter Erkrankungen. Bei den meisten subepidermalen blasenbildenden Autoimmundermatosen führt die alleinige Bindung der Autoantikörper nicht zur Blasenbildung. Vielmehr sind eine Reihe Fc-vermittelter Mechanismen beschrieben, die zur Generierung eines pro-inflammatorischen Milieus in der Haut beitragen. Dies führt zur Extravasation von Leukozyten in die Haut, die dann letztendlich zur Blasenbildung führt. Eine wichtige Funktion des Fc-Fragmentes der IgG-Antikörper ist die Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg (Karsten & Kohl, 2012; Kemper & Kohl, 2013; Kohl & Gessner, 1999). In experimentellen Modellen der Autoantikörper-induzierten Gewebeschädigung konnte sowohl für das bullöse Pemphigoid (Heimbach *et al.* , 2009; Liu *et al.* , 2008) als auch für die EBA (Mihai *et al.* , 2007; Sitaru *et al.* , 2005)) gezeigt werden, dass die Aktivierung des Komplementsystems für die Blasenbildung notwendig ist. In beiden Modellen waren Komplementfaktor C5-defiziente Mäuse (fast) komplett vor der Induktion eines experimentellen BP/EBA geschützt (Schmidt & Zillikens, 2013). Interessanterweise zeigten die Modelle des BP und der EBA Unterschiede hinsichtlich der Aktivierung des Komplementsystems. Bei dem experimentellen bullösen Pemphigoid in neonatalen Mäusen wurde gezeigt, dass die Induktion einer Blasenbildung abhängig von Komplementfaktor C5 ist. Die Antikörper des bullösen Pemphigoid führen somit zu einer Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg. Im Gegensatz hierzu spielte die Komplementaktivierung über den alternativen Weg in der experimentellen EBA eine wesentliche Rolle (Mihai *et al.* , 2007). Neuere Daten der Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass die Aktivierung des Komplementsystems an der Pathogenese der EBA beteiligt ist. Die Immunisierung einer Auszuchtmauslinie (AIL) mit Typ VII Kollagen führte bei den meisten der Tiere zur Bildung von anti-Typ-VII-Kollagen-IgG und in 33% der Tiere

zur klinischen EBA-Manifestation (Ludwig *et al.* , 2011). In diesem Experiment war die Komplementaktivierung mit der klinischen EBA Manifestation assoziiert. Dabei wurde die Komplementaktivierung anhand der Ablagerung von Komplementfaktor C3 entlang der dermo-epidermalen Junktionszone gemessen. Es konnte aber auch eine C3-Ablagerung entlang der dermo-epidermalen Junktionszone in einigen klinisch gesunden Tieren nachgewiesen werden.

Diese Befunde weisen darauf hin, dass nach der Bildung der Immunkomplexe in der Haut weitere Mechanismen zur Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut in die Haut notwendig sind. Diese könnten auch zur leukozytären Infiltration bei IgA-vermittelten blasenbildenden Autoimmundermatosen beitragen, da IgA allgemein ein schlechter Aktivator des Komplementsystems ist (Bogers *et al.* , 1991; Daha *et al.* , 2011) und auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen nicht zu einer Ablagerung von Komplement an der dermo-epidermalen Junktionszone führte.

Die Komplementaktivierung führt jedoch neben der Generierung eines chemotaktischen Gradienten auch zur weiteren Aktivierung Fc γ -Rezeptoren exprimierender Zellen. Die Bindung von C5a erhöht die Expression aktivierender Fc γ -Rezeptoren, während die Expression des inhibitorischen Fc γ -Rezeptors IIB reduziert wird (Godau *et al.* , 2004; Karsten *et al.* , 2012; Kohl & Gessner, 1999). Durch diese Veränderung führt die Bindung dieser Zellen an Immunkomplexe zu einer verstärkten zellulären Aktivierung. Kürzlich konnte auch eine Regulation der C5aR-induzierten pro-inflammatorischen Genregulation durch Fc γ -Rezeptoren identifiziert werden (Karsten *et al.* , 2012). Die Bindung hochgalaktosylierter Immunkomplexe an den inhibitorischen Fc γ -Rezeptor IIB und an Dectin-1 hemmt die pro-inflammatorische Signaltransduktion, die durch Bindung von C5a an den C5a-Rezeptor induziert wird.

Neben der wichtigen Rolle an der Autoantikörper-induzierten Gewebeschädigung bei blasenbildenden Autoimmundermatosen und anderen Autoantikörper-vermittelten Erkrankungen scheint das Komplementsystem auch in die Generierung von Immunantworten eingebunden zu sein. So konnte eine konträre Rolle des Komplementsystems beim Asthma beschrieben werden (Skokowa *et al.* , 2005): In Analogie zu den Autoimmundermatosen trägt die Aktivierung des Komplementsystems beim Asthma zur Pathogenese der Effektorphase bei. Bei der Induktion des Toleranzverlustes beim experimentellen Asthma scheint die Aktivierung des Komplementsystems jedoch eher immunmodulatorische Eigenschaften aufzuweisen und die pathogenetische Th2-Immunantwort in Richtung einer (beim Asthma) nicht pathogenen Th1-Immunantwort zu polarisieren (Zhang *et al.* , 2010). Die Rolle des Komplementsystems bei der Autoantikörperproduktion im Rahmen von blasenbildenden Autoimmundermatosen ist völlig unklar. Bei

Patienten mit bullösem Pemphigoid wurde ein Th2-Zytokinmilieu im Serum festgestellt (D'Auria *et al.* , 1999). Die funktionelle Relevanz ist jedoch unklar. Bei experimenteller EBA trägt eine Polarisierung zu einer Th1-Immunantwort entscheidend zur Pathogenese bei (Hammers *et al.* , 2011). Es ist somit davon auszugehen, dass eine Inhibition der Komplementaktivierung während des Toleranzverlustes gegenüber Strukturproteinen der Haut wahrscheinlich eher eine verstärkte pathologische Immunantwort induzieren würde. Daher sollte eine Therapie mit Eculizumab, einem Komplementinhibitor gegenüber Protein 5 (Kelly *et al.* , 2011), bei Patienten mit bullösem Pemphigoid und EBA bis zur weiteren Klärung der Rolle des Komplement-Systems in der Frühphase dieser Erkrankungen eher nicht eingesetzt werden.

Darüber hinaus konnte im neonatalen BP-Mausmodell gezeigt werden, dass das Fc-Fragment von Autoantikörpern Mastzellen und residente Makrophagen in der Haut aktiviert. Dies wiederum bewirkt u.a. die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten, der maßgeblichen Effektorzellen beim bullösen Pemphigoid (Liu, 2004) und der EBA (Ludwig, 2012; Ludwig *et al.* , 2013). Diese Befunde konnten jedoch bei der experimentellen EBA bei adulten Mäusen nicht reproduziert werden (Frank Petersen, Forschungszentrum Borstel, Deutschland, persönliche Kommunikation). Ob dieser Unterschied aufgrund des differenten Alters der Mäuse oder aufgrund der Erkrankung an sich besteht, ist momentan Untersuchungsgegenstand in der Arbeitsgruppe. Hierzu wurde kürzlich ein Autoantikörpertransfer-Modell in adulten Mäusen etabliert.

Neben diesen Fc-abhängigen Mechanismen, die zur Extravasation neutrophiler Granulozyten in die Haut beitragen, gibt es gute Hinweise auf weitere Fc-unabhängige Abläufe, die dies vermitteln können. Die Inkubation von Keratinozyten, welche Typ XVII Kollagen auf ihrer Oberfläche exprimieren, mit IgG-Autoantikörpern von BP-Patienten führt zur zeit- und dosisabhängigen Freisetzung von IL-6 und IL-8 (Schmidt *et al.* , 2000a). Dies deutet darauf hin, dass Keratinozyten in der Lage sind Autoantikörperinduzierte Entzündungsreaktionen zu modulieren. Ob die anti-Typ-XVII-Kollagen-induzierte Zytokinfreisetzung aus Keratinozyten pro- oder anti-inflammatorische Eigenschaften aufweist, ist unklar. Im Modell der durch Autoantikörpertransfer induzierten EBA konnte gezeigt werden, dass IL-6 eindeutig anti-inflammatorische Eigenschaften aufweist (Samavedam *et al.* , 2013). Sowohl IL-6 defiziente Mäuse als auch mit anti-IL-6 behandelte Wildtyp Mäuse zeigten nach Injektion von anti-Typ-VII-Kollagen-IgG eine bis zu 2-fach verstärkte klinische Manifestation im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren. Die Blockade des IL-6 *trans-signalling* (Rose-John, 2012; Scheller *et al.* , 2006) hatte dagegen keinen Einfluss auf den klinischen Schweregrad der experimentellen EBA. Im Gegensatz hierzu führte die Applikation von rekombinantem IL-6 dosis-

abhängig zu einer Reduktion der klinisch manifesten Blasenbildung; in hohen Dosen führte die IL-6 Applikation sogar fast zu einer kompletten Inhibition der EBA-Induktion. Diese Effekte des IL-6 waren vor allem mit der Induktion des IL-1 Antagonisten IL-1ra verbunden. Darüber hinaus konnten die Effekte der IL-6 Applikation mit der Gabe des IL-1ra Anakinra teilweise rekapituliert werden (Samavedam *et al.* , 2013). Dies weist auf eine proinflammatorische Rolle des IL-1 bei der Autoantikörper-induzierten Blasenbildung der EBA hin. Diese Annahme wurde durch Befunde an IL-1R defizienten Mäusen und an Mäusen, die mit anti-Il1beta behandelt wurden, bestätigt. In diesen Tieren kam es zu einer Reduktion der Autoantikörper-induzierten EBA. Darüber hinaus hatte die Behandlung von an EBA erkrankten Mäusen mit Anakinra therapeutische Effekte (Sadeghi, mündliche Mitteilung). Neben IL-1 und IL-6 beeinflusst IL-8 (bzw. dessen murine Analoga) die Blasenbildung bei EBA. Die Blockade des CXCL1 und CXCL2 reduziert den klinischen Schweregrad einer experimentellen EBA in einem prophylaktischen und therapeutischen Ansatz (Hirose *et al.* , 2013). Diese Fc-unabhängigen Mechanismen tragen mit großer Wahrscheinlichkeit zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Haut bei, wenn die in der Haut gebundenen Immunkomplexe aus IgA-Autoantikörpern bestehen. Dies ist jedoch nicht experimentell nachgewiesen. Kürzlich hat die Arbeitsgruppe die Entstehung von anti-Typ-VII-Kollagen-IgA-Autoantikörper nach Immunisierung mit Fragmenten des Typ VII Kollagens im aktiven Mausmodell festgestellt, wobei deren Einbindung in die Krankheitsentwicklung noch unbekannt ist (Iwata, mündliche Mitteilung).

Rekombinante IgA1- und IgA2-Autoantikörper aktivieren dosisabhängig neutrophile Granulozyten und führen zu einer dermo-epidermalen Spaltbildung

Um die Wirkung der rekombinanten Autoantikörper auf zelluläre Komponenten des angeborenen Immunsystems zu untersuchen, wurden zwei Krankheitsmodelle verwendet. Beim ersten wurden Mikrotiterplatten mit Autoimmunkomplexen aus rekombinanten Fragmenten des Typ VII Kollagens und IgA1- sowie IgA2-Autoantikörpern beschichtet und die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aus hinzugefügten gesunden neutrophilen Granulozyten durch luminol-verstärkte Chemilumineszenz nachgewiesen. Hierbei zeigte sich, dass sowohl IgA1 als auch IgA2 eine dosisabhängige Aktivierung der ROS-Produktion bei den neutrophilen Granulozyten bewirkten. Diese war vergleichbar mit der von rekombinantem IgG1, welches als Positivkontrolle mitgeführt wurde. Beim zweiten Krankheitsmodell wurden Kryoschnitte menschlicher Haut sowohl mit rekombinanten Autoantikörpern als auch mit Seren von Patienten mit IgA-EBA inkubiert

und danach mit frisch isolierten Leukozyten beschichtet. Die Ausbildung einer Spaltbildung zwischen Dermis und Epidermis wurde nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung mikroskopisch bestimmt. Hierbei zeigte sich bei den Patientenseren eine ausgeprägte dermo-epidermale Spaltbildung, die zum Teil deutlich ausgeprägter als bei der mitgeführten Kontrolle mit Seren von Patienten mit IgG-EBA war. Ebenso zeigte sich nach der Inkubation mit rekombinanten IgA1- und IgA2-Autoantikörpern eine ausgeprägte und dosisabhängige Spaltbildung.

Hier spiegeln diese beiden Krankheitsmodelle zwei wichtige bekannte Pathogenesefaktoren bei der EBA wieder: die Fc-Rezeptor abhängige Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (Kasperkiewicz *et al.* , 2012) und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Chiriac *et al.* , 2007). Dabei ist die Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems letztlich der abschließende Schritt in der Pathogenese subepidermal blasenbildender Autoimmundermatosen. Nach Extravasation der Effektorzellen aus dem Blutstrom in die Haut erfolgt dort die Bindung an die Fc-Fragmente der in der Haut gebundenen Immunkomplexe. Die wesentlichen Effektorzellen sind Gr-1 positive neutrophile Granulozyten und ggf. Monozyten/Makrophagen (Chiriac *et al.* , 2007).

Im Fall der Fc γ -Rezeptoren konnte bei dem experimentellem bullösen Pemphigoid in neonatalen Mäusen gezeigt werden, dass die Interaktionen zwischen den Fc-Fragmenten der Immunkomplexe und den spezifischen Fc γ -Rezeptoren essentiell für die Pathogenese der Blasenbildung sind (Heimbach *et al.* , 2009; Leighty *et al.* , 2007; Zhao *et al.* , 2006). Erste Hinweise hierzu lieferte bereits die Beobachtung, dass Kaninchen-anti-Maus-Typ-XVII-Kollagen-IgG-Antikörper, nicht aber die korrespondierenden F(ab) Fragmente, in neonatalen Mäusen ein experimentelles BP induzierten (Liu *et al.* , 1993). Spätere Untersuchungen zeigten, dass Fc γ -Rezeptor-defiziente Mäuse (Fc γ RIII $^{-/-}$ und Fc γ RI&III $^{-/-}$), bei welchen die aktivierenden Fc γ -Rezeptoren nicht exprimiert werden, komplett gegenüber der Induktion eines experimentellen BP geschützt sind (Zhao *et al.* , 2006). Die Blockade einzelner aktivierender Fc γ -Rezeptoren zeigte, dass die Pathogenität der Autoantikörper ausschließlich über eine Bindung an Fc γ RIII vermittelt wurde, während der aktivierende Fc γ RI und der inhibitorische Fc γ RIIB keinen Einfluss auf die Manifestation eines experimentellen BP hatten (Zhao *et al.* , 2006). Diese Befunde wurden in *ex-vivo* Modellen unter Verwendung von humanen Biomaterialien validiert: die Blockade von Fc γ RII und Fc γ RIII, nicht aber von Fc γ RI, führte zu einer fast kompletten Inhibition der dermo-epidermalen Spaltbildung (Yu *et al.* , 2010). Diese Daten aus experimentellen Modellen des bullösen Pemphigoid wurden im Wesentlichen bei experimenteller EBA bestätigt. Jedoch schienen auch Unterschiede zwischen den beiden Modellen zu bestehen. In Analogie zu dem experimentellen BP in neonatalen Mäusen

führt allein die Injektion von Kaninchen-anti-Maus-Typ-VII-Kollagen, nicht aber korrespondierender Fab-Fragmente zur Induktion einer experimentellen EBA (Sitaru *et al.* , 2005). Dazu passend sind Tiere mit fehlender Expression aller aktivierenden $Fc\gamma$ Rezeptoren komplett vor der Induktion einer EBA geschützt. Ebenfalls führt die Injektion von anti-Typ-VII-Kollagen-IgY-Antikörpern, welches nicht an murine $Fc\gamma$ Rezeptoren bindet (Ambrosius & Hadge, 1987), nicht zur Induktion einer experimentellen EBA in adulten Mäusen (Sesarman *et al.* , 2008). Im Gegensatz zum experimentellen bullösen Pemphigoid in neonatalen Mäusen wird bei der experimentellen EBA in adulten Tieren, die Pathogenität der Autoantikörper allein über den $Fc\gamma$ RIV vermittelt; die anderen aktivierenden $Fc\gamma$ Rezeptoren I und III tragen nicht zur Blasenbildung bei (Kasperkiewicz *et al.* , 2012). Die fehlende Expression des inhibitorischen $Fc\gamma$ RIIB führt zu einer signifikant erhöhten klinischen Krankheitsaktivität, was auf eine protektive Rolle dieses Rezeptors bei EBA hinweist (Hashimoto *et al.* , 2012). Für alle anderen blasenbildenden Autoimmundermatosen wurde die Rolle der $Fc\gamma$ R nicht weiter charakterisiert.

Im Fall von IgA-Immunkomplexen konnte in der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass es zu einer $Fc\alpha$ RI/CD89-abhängigen Bindung neutrophiler Granulozyten an die IgA-Immunkomplexe kommt (Recke, mündliche Mitteilung). Im oben genannten ROS-Release konnte dabei durch inhibitorische Antikörper gegen den $Fc\alpha$ -Rezeptor I die Freisetzung von ROS inhibiert werden. Dies weist auf eine zentrale Rolle dieses Rezeptors hin. Da es bei Mäusen aufgrund der fehlenden Expression von CD89 keinen entsprechenden homologen Antikörper gibt (Decot *et al.* , 2005; van Egmond *et al.* , 1999), ist es momentan nicht möglich, dies *in-vivo* zu validieren. Perspektivisch könnte dies jedoch relativ zeitnah experimentell umgesetzt werden: Die hier verwendeten IgA-Autoantikörper könnten so umklontiert werden, dass anstelle des humanen Fc-Anteils ein muriner Fc-Anteil an die Variable des anti-human-Typ-VII-Kollagen-Antikörpers kloniert wird. Dieser "murinisierte" Antikörper könnte dann in Typ VII Kollagen knock-out Mäusen, die das humane Typ VII Kollagen transgen tragen (Ito *et al.* , 2009), appliziert werden. An diesem Modell könnte die Pathogenität der IgA-Autoantikörper *in-vivo* getestet werden. Unter Verwendung dieser Typ VII Kollagen knock-out Mäuse konnte in der Arbeitsgruppe kürzlich die Pathogenität gegen humanes Typ VII Kollagen *in-vivo* nachgewiesen werden (Vorobyev, Arbeitsgruppe Autoimmunität, mündliche Mitteilung). Alternativ hierzu könnte das vor kurzem nachgewiesene anti-Maus-Typ-VII-Kollagen aus mit Typ VII Kollagen immunisierten Tieren isoliert werden und in gesunde Mäuse transferiert werden.

Als weiterer Pathogeneseschritt in der EBA gilt die $Fc\gamma$ -Rezeptor-induzierte Signaltransduktion, die zur Aktivierung neutrophiler Granulozyten führt: Die Bindung der $Fc\gamma$

Rezeptoren an die in der Haut gebundenen Immunkomplexe induziert eine intrazelluläre Signaltransduktion, die die Bindung an die Immunkomplexe in eine biologische Antwort "übersetzt". Die Bindung aktivierender Fc γ Rezeptoren führt zunächst zu einer Aktivierung von Spleen-Tyrosine-Kinase (SYK) (Crowley *et al.* , 1997; Kiefer *et al.* , 1998). Bisher unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass diese SYK-Expression zur Induktion von Blasen unabdingbar ist (unveröffentlicht). Nachfolgend kann es zur weiteren Aktivierung einer Reihe von Signaltransduktionswegen kommen. In experimentellen Modellen des bullösen Pemphigoid / der EBA konnte gezeigt werden, dass die Blockade von extrazellulär-regulierter Kinase (ERK), p38-mitogen-aktivierter Kinase (MAPK), Phosphoinositid-3-Kinase β (PI3K) und Akt die Induktion einer experimentellen EBA durch Transfer von Autoantikörpern modulieren kann. Die Applikation von entsprechenden Inhibitoren reduziert das Ausmaß der Blasenbildung dosisabhängig (Hellberg *et al.* , 2013; Kulkarni *et al.* , 2011).

Hinsichtlich der durch die Bindung an IgA-Immunkomplexe induzierten Signaltransduktion bei den blasenbildenden Autoimmundermatosen liegen bisher keine Daten vor.

Des Weiteren ist eine Freisetzung von Effektormolekülen, die zur Zerstörung der dermo-epidermalen Junktionszone und somit zur Blasenbildung führen für die Pathogenese der EBA bedeutend: Binden neutrophile Granulozyten an die entlang der dermo-epidermalen Junktionszone lokalisierten IgG-Immunkomplexe, führt dies zu einer Aktivierung der neutrophilen Granulozyten. Dies wiederum ruft die Freisetzung einer Reihe von biologisch aktiven Substanzen aus den neutrophilen Granulozyten hervor. Hiervon sind zumindest zwei direkt an der Blasenbildung beteiligt: Reaktive Sauerstoffspezies und proteolytische Enzyme (Elastase und Gelatinase B). Ex vivo kann die Induktion der dermo-epidermalen Spaltbildung, induziert durch Inkubation von Gefrierschnitten humaner Haut mit Autoantikörpern und neutrophilen Granulozyten, komplett durch die Blockade von Elastase oder Gelatinase B inhibiert werden (Shimanovich *et al.* , 2004). Interessanterweise ist dies nicht nur ein "zerstörender" Prozess, sondern die entstehenden Fragmente können unter Umständen auch chemotaktisch wirksam sein (Heimbach *et al.* , 2009). Ebenfalls ist bei fehlender Freisetzung von ROS die Autoantikörper-induzierte Blasenbildung bei experimenteller EBA komplett inhibiert. Dies konnte sowohl ex-vivo anhand des Kryoschnitt-Modells als auch in-vivo unter Verwendung entsprechender knock-out Mäuse gezeigt werden (Chiriac *et al.* , 2007).

Hinsichtlich IgA-mediierter subepidermaler blasenbildender Autoimmundermatosen ist von analogen Pathomechanismen auszugehen. Dies ist jedoch bisher nicht experimentell bearbeitet worden.

Durch die beiden Krankheitsmodelle ROS-Release und Kryosection-Assay konnte in dieser Arbeit die direkte pathogenetische Bedeutung der IgA-Autoantikörper sowohl für die Gewebeerstörung als auch für die Blasenbildung bei Krankheiten mit IgA-Reaktivität gegenüber Kollagen Typ VII nachgewiesen werden.

4.5 Verändertes Pathogenesemodell der Epidermolysis bullosa acquisita

Die hier nachgewiesene Pathogenität der IgA-Autoantikörper gegen humanes Typ VII Kollagen trägt auch zur Änderung des Verständnisses der Pathogenese der Blasenbildung bei der EBA bei. Bisher ging man aufgrund der Untersuchungen an IgG-Autoantikörpern von den folgenden pathogenetisch relevanten Punkten aus. Dabei kann die Pathogenese der EBA zunächst in drei wesentliche Abschnitte unterteilt werden: initialer Toleranzverlust, Aufrechterhaltung des Toleranzverlustes und verlängerte Autoantikörper-Halbwertszeit sowie Gewebeerstörung mit Blasenbildung. Hier sollen nun noch einmal in Kürze die bisher bekannten wichtigen Faktoren bei der Induktion der Blasenbildung aufgezählt werden. Zunächst erfolgt eine Bindung der Autoantikörper an der dermo-epidermalen Junktionszone. Diese Autoantikörper sind fähig, Komplement entlang der dermo-epidermalen Junktionszone zu binden (Sitaru *et al.* , 2006) und das Komplementsystem auf dem alternativen Weg zu aktivieren (Mihai *et al.* , 2007). Es kommt zu einer Rekrutierung von Neutrophilen entlang der dermo-epidermalen Junktionszone sowie zu einer Fc-Rezeptor-abhängigen Aktivierung (Kasperkiewicz *et al.* , 2012) der neutrophilen Granulozyten. Dies führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Chiriac *et al.* , 2007) und zur Bildung der Proteasen Elastase und Gelatinase B (Shimanovich *et al.* , 2004). Dadurch wird eine Trennung der Dermis von der Epidermis induziert, was klinisch als subepidermale Blase imponiert.

Auf der Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche lassen sich nun folgende Pathogenesefaktoren postulieren: Bindung der IgA1- und IgA2-Antikörper an die dermo-epidermale Junktionszone, fehlende Induktion der Komplementablagerung von C3b entlang der dermo-epidermalen Junktionszone, Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aus aktivierten neutrophilen Granulozyten und Leukozyten-induzierte dermo-epidermale Spaltbildung. Dieses Pathogenesemodell wirft die Frage nach der Möglichkeit einer Aktivierung der neutrophilen Granulozyten unabhängig vom klassischen Komplementweg auf. Die Aktivierung von Komplement durch Bindung an die Autoantikörper galt bisher als ein elementarer Faktor für die Induktion einer Blasenbildung (Mi-

hai *et al.* , 2007; Sitaru *et al.* , 2006) und der Chemoattraktion des zellulären Immunsystems, insbesondere von neutrophilen Granulozyten (Liu *et al.* , 2008; Mihai *et al.* , 2007; Sitaru *et al.* , 2005, 2006). Es bleibt für IgA ein sekundärer Mechanismus zu diskutieren, der die Rolle des Komplementsystems übernimmt. In Frage käme die Ausschüttung von Leukotrien B4 durch pro-inflammatorische Zellen (van der Steen *et al.* , 2009, 2012).

Es bleibt somit als Gegenstand weiterer Forschungen die Untersuchung der einzelnen Schritte der Aktivierung und Chemoattraktion von neutrophilen Granulozyten durch IgA-Autoantikörper.

4.6 Klinische Relevanz und Ausblick

Der Nachweis von zirkulierenden Autoantikörpern im Patientenserum ist für die Diagnosestellung einer blasenbildenden Autoimmundermatose erforderlich. Jedoch ist der Antikörpertiter bzw. sein Verlauf auch ein wichtiger Monitorparameter für die Überwachung der Krankheitsaktivität und ihres Verlaufes (Kim *et al.* , 2013). Bisher werden IgA-Autoantikörper zwar in der Routinediagnostik mittels direkter und indirekter Immunfluoreszenz sowie im dermalen Immunoblot miterfasst. Jedoch gibt es für den Nachweis von IgA-Autoantikörpern bis dato keinen kommerziellen ELISA, wie er in der Routine für IgG z.B. beim bullösen Pemphigoid eingesetzt wird. Der Nachweis der direkten Pathogenität von IgA-Autoantikörpern gegenüber dem Kollagen Typ VII führt zu der Diskussion der Notwendigkeit eines solchen ELISA. Für die Entwicklung dessen könnten die rekombinanten IgA-Autoantikörper verwendet werden.

Bezüglich der Therapie wurde bisher viel Energie in die Forschung von Immunapherese-Methoden bei Patienten mit IgG vermittelten blasenbildenden Erkrankungen investiert (Eming & Hertl, 2006; Recke *et al.* , 2011; Schmidt & Zillikens, 2010). Die Entfernung von IgG aus dem Patientenserum reduziert dabei erfolgreich die Krankheitsaktivität. Zu diskutieren wäre hier die Entwicklung einer IgA-spezifischen Apherese.

Es bedarf daher dringend einer weiteren Beforschung diagnostischer Methoden speziell für den Nachweis von IgA-Autoantikörpern sowie weiterer therapeutischer Strategien. Dies soll Gegenstand folgender wissenschaftlicher Arbeiten und spannender Diskussionen sein.

5 Zusammenfassung

Die Epidermolysis bullosa acquisita ist eine seltene subepidermale blasenbildende Erkrankung. Sie ist mit der Bildung von Autoantikörpern gegen das humane Kollagen Typ VII assoziiert. Bisher wurde die Pathogenität von IgG-Autoantikörpern in verschiedenen *ex-vivo* und *in-vivo* Modellen nachgewiesen. Hierbei spielt eine Ablagerung der IgG-Antikörper entlang der dermo-epidermalen Junctionszone, die Aktivierung des Komplementsystems, die Fc-Rezeptor abhängige Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies eine wesentliche Rolle bei der Induktion der Blasenbildung.

Durch den wiederholten zusätzlichen Nachweis einer IgA-Reaktivität gegen Kollagen Typ VII in den Seren von EBA-Patienten sowie bei einem Drittel der Fälle einer alleinigen IgA-Reaktivität, stellte sich die Frage nach der Pathogenität der IgA-Autoantikörper. Um die Pathogenität von IgA-Autoantikörpern zu belegen, wurden daher IgA1- und IgA2-Autoantikörper gegenüber humanem Kollagen Typ VII rekombinant produziert. Im Folgenden wurden die rekombinanten IgA-Autoantikörper in einer Reihe von Versuchen im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer pathogenen Wirkung untersucht.

Durch meine Versuche konnte ich belegen, dass die rekombinanten IgA-Autoantikörper im Immunoblot an humanes Kollagen Typ VII und in der indirekten Immunfluoreszenz an die dermo-epidermale Junctionszone binden. Im indirekten Komplementbindungstest konnte ich nachweisen, dass die IgA1- und IgA2-Autoantikörper nicht fähig sind, eine Komplementablagerung von C3b zu induzieren. Im ROS-Release konnte mittels immobilisierten Immunkomplexen eine konzentrationsabhängige Ausschüttung von reaktiven Sauerstoff-Radikalen aus neutrophilen Granulozyten belegt werden. Außerdem konnte ich im Kryoschnitt-Assay nach der Inkubation von Gefrierschnitten humaner Haut mit den rekombinanten Autoantikörpern und frisch isolierten Leukozyten eine dermo-epidermale Spaltbildung nachweisen. Des Weiteren konnte ich in diesem Versuch zeigen, dass Seren von Patienten mit IgA-EBA ebenfalls fähig sind, eine dermo-epidermale Spaltbildung zu induzieren.

Diese Arbeit liefert somit den Nachweis der Pathogenität von rekombinant hergestellten IgA1- und IgA2-Autoantikörpern gegen humanes Kollagen Typ VII. Dieser Nachweis ist

grundlegend für die Entwicklung von diagnostischen und therapeutischen Verfahren bei den IgA-vermittelten Autoimmundermatosen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abasq, C, Mouquet, H, Gilbert, D, Tron, F, Grassi, V, Musette, P, & Joly, P. 2009. ELISA testing of anti-desmoglein 1 and 3 antibodies in the management of pemphigus. *Arch Dermatol*, 145(5), 529–35.
2. Alonso-Llamazares, J, Gibson, LE, & Rogers, RS. 2007. Clinical, pathologic, and immunopathologic features of dermatitis herpetiformis: review of the Mayo Clinic experience. *Int J Dermatol*, 46(9), 910–919.
3. Ambrosius, H, & Hadge, D. 1987. Chicken immunoglobulins. *Vet Immunol Immunopathol*, 17(1-4), 57–67.
4. Bernard, P, Vaillant, L, Labeille, B, Bedane, C, Arbeille, B, Denoeux, JP, Lorette, G, Bonnetblanc, JM, & Prost, C. 1995. Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group. *Arch Dermatol*, 131(1), 48–52.
5. Berthoux, F, Suzuki, H, Thibaudin, Li, Yanagawa, H, Maillard, N, Mariat, C, Tomino, Y, Julian, BA, & Novak, J. 2012. Autoantibodies targeting galactose-deficient IgA1 associate with progression of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 23(9), 1579–87.
6. Bieber, K, Sun, S, Ishii, N, Kasperkiewicz, M, Schmidt, E, Hirose, M, Westermann, J, Yu, X, Zillikens, D, & Ludwig, RJ. 2010. Animal models for autoimmune bullous dermatoses. *Exp Dermatol*, 19(1), 2–11.
7. Binstadt, BA, Patel, PR, Alencar, H, Nigrovic, PA, Lee, DM, Mahmood, U, Weissleder, R, Mathis, D, & Benoist, C. 2006. Particularities of the vasculature can promote the organ specificity of autoimmune attack. *Nat Immunol*, 7(3), 284–92.
8. Bogers, WM, Stad, RK, van Es, LA, & Daha, MR. 1991. Immunoglobulin A: interaction with complement, phagocytic cells and endothelial cells. *Complement Inflamm*, 8(5-6), 347–358.
9. Brandtzaeg, P. 2010. Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 26(6), 554–63.

10. Buijsrogge, JJA, de Jong, MCJM, Meijer, HJ, Dijk, F, Jonkman, MF, & Pas, HH. 2005. Inflammatory epidermolysis bullosa acquisita with coexistent IgA antibodies to plectin. *Clin Exp Dermatol*, 30(5), 531–534.
11. Buijsrogge, JJA, Diercks, GFH, Pas, HH, & Jonkman, MF. 2011. The many faces of epidermolysis bullosa acquisita after serration pattern analysis by direct immunofluorescence microscopy. *Br J Dermatol*, 165(1), 92–98.
12. Chen, M, Doostan, A, Bandyopadhyay, P, Remington, J, Wang, X, Hou, Y, Liu, Z, & Woodley, DT. 2007. The cartilage matrix protein subdomain of type VII collagen is pathogenic for epidermolysis bullosa acquisita. *Am J Pathol*, 170(6), 2009–2018.
13. Chen, M, Kim, GH, Prakash, L, & Woodley, DT. 2012. Epidermolysis bullosa acquisita: autoimmunity to anchoring fibril collagen. *Autoimmunity*, 45(1), 91–101.
14. Chhabra, S, Minz, RW, & Saikia, B. 2012. Immunofluorescence in dermatology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 78(6), 677–91.
15. Chiriac, MT, Roesler, J, Sindrilaru, A, Scharffetter-Kochanek, K, Zillikens, D, & Sitaru, C. 2007. NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *J Pathol*, 212(1), 56–65.
16. Crowley, MT, Costello, PS, Fitzner-Attas, CJ, Turner, M, Meng, F, Lowell, C, Tybulewicz, VL, & DeFranco, AL. 1997. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcγ receptors on macrophages. *J Exp Med*, 186(7), 1027–1039.
17. Csorba, K, Schmidt, S, Florea, F, Ishii, N, Hashimoto, T, Hertl, M, Kárpáti, S, Bruckner-Tuderman, L, Nishie, W, & Sitaru, C. 2011. Development of an ELISA for sensitive and specific detection of IgA autoantibodies against BP180 in pemphigoid diseases. *Orphanet J Rare Dis*, 6, 31.
18. Csorba, K, Sitaru, S, & Sitaru, C. 2012. Granulocyte-dependent autoantibody-induced skin blistering. *J Vis Exp*, e4250, online published.
19. Daha, NA, Banda, NK, Roos, A, Beurskens, FJ, Bakker, JM, Daha, MR, & Trouw, LA. 2011. Complement activation by (auto-)antibodies. *Mol Immunol*, 48(14), 1656–1665.
20. D’Auria, L, Mussi, A, Bonifati, C, Mastroianni, A, Giacalone, B, & Ameglio, F. 1999. Increased serum IL-6, TNF-α and IL-10 levels in patients with bullous pemphigoid: relationships with disease activity. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 12(1), 11–15.

21. Decot, V, Woerly, G, Loyens, M, Loiseau, S, Quatannens, B, Capron, M, & Dombrowicz, D. 2005. Heterogeneity of expression of IgA receptors by human, mouse, and rat eosinophils. *J Immunol*, 174(2), 628–35.
22. Delgado, L, Aoki, V, Santi, C, Gabbi, T, Sotto, M, & Maruta, C. 2011. Clinical and immunopathological evaluation of epidermolysis bullosa acquisita. *Clin Exp Dermatol*, 36(1), 12–8.
23. Di Zenzo, G, Della Torre, R, Zambruno, G, & Borradori, L. 2012. Bullous pemphigoid: from the clinic to the bench. *Clin Dermatol*, 30(1), 3–16.
24. Döpp, R, Schmidt, E, Shimanovitch, I, Leverkus, M, Bröcker, EB, & Zillikens, D. 2000. 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*, 42(4), 577–83.
25. Duvert-Lehembre, S, & Joly, P. 2013. Autoimmune blistering diseases. *Rev Med Interne*, Jun, Artikel ID revmed.2013.04.016, online published.
26. Ebert, EC. 2008. Gastrointestinal manifestations of Henoch-Schonlein Purpura. *Dig Dis Sci*, 53(8), 2011–9.
27. Elgert, KD. 2009. *Immunology: Understanding The Immune System*. 2nd edn. Kapitel 4, Seite 59-76. Wiley.
28. Eming, R, & Hertl, M. 2006. Immunoabsorption in pemphigus. *Autoimmunity*, 39(7), 609–616.
29. España, A, del Olmo, J, Marquina, M, & Sitaru, C. 2005. Mucous membrane pemphigoid: IgG and IgA antibodies against the BP180 antigen. *Actas Dermosifiliogr*, 96(6), 365–370.
30. Feng, S, Wu, Q, Jin, P, Lin, L, Zhou, W, Sang, H, & Shao, C. 2008. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Int J Dermatol*, 47(3), 225–228.
31. Gammon, WR, & Briggaman, RA. 1993. Epidermolysis bullosa acquisita and bullous systemic lupus erythematosus. Diseases of autoimmunity to type VII collagen. *Dermatol Clin*, 11(3), 535–47.
32. Giudice, GJ, Emery, DJ, & Diaz, LA. 1992. Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J Invest Dermatol*, 99(3), 243–50.

33. Giudice, GJ, Emery, DJ, Zelickson, BD, Anhalt, GJ, Liu, Z, & Diaz, LA. 1993. Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Immunol*, 151(10), 5742–50.
34. Godau, J, Heller, T, Hawlisch, H, Trappe, M, Howells, E, Best, J, Zwirner, J, Verbeek, JS, Hogarth, PM, Gerard, C, Van Rooijen, N, Klos, A, Gessner, JE, & Kohl, J. 2004. C5a initiates the inflammatory cascade in immune complex peritonitis. *J Immunol*, 173(5), 3437–3445.
35. Hammers, CM, Bieber, K, Kalies, K, Banczyk, D, Ellebrecht, CT, Ibrahim, SM, Zillikens, D, Ludwig, RJ, & Westermann, J. 2011. Complement-fixing anti-type VII collagen antibodies are induced in Th1-polarized lymph nodes of epidermolysis bullosa acquisita-susceptible mice. *J Immunol*, 187(10), 5043–50.
36. Hashimoto, T, Ishii, N, Ohata, C, & Furumura, M. 2012. Pathogenesis of epidermolysis bullosa acquisita, an autoimmune subepidermal bullous disease. *J Pathol*, 228(1), 1–7.
37. Heimbach, L, Li, N, Diaz, A, & Liu, Z. 2009. Experimental animal models of bullous pemphigoid. *G Ital Dermatol Venereol*, 144(4), 423–31.
38. Hellberg, L, Samavedam, UKSRL, Holdorf, K, Hänsel, M, Recke, A, Beckmann, T, Steinhorst, K, Boehncke, WH, Kirchner, T, Möckel, N, Solbach, W, Zillikens, D, Schmidt, E, Ludwig, RJ, & Laskay, T. 2013. Methylprednisolone Blocks Autoantibody-Induced Tissue Damage in Experimental Models of Bullous Pemphigoid and Epidermolysis Bullosa Acquisita through Inhibition of Neutrophil Activation. *J Invest Dermatol*, Feb, Artikel ID jid.2013.91, online published.
39. Hertl, M, & Schuler, G. 2002. Bullous autoimmune dermatoses. 1: Classification. *Hautarzt*, 53(3), 207–19.
40. Hiemstra, PS., Biewenga, J, Gorter, A, Stuurman, ME, Faber, A, van Es, LA, & Daha, MR. 1988. Activation of complement by human serum IgA, secretory IgA and IgA1 fragments. *Mol Immunol*, 25(6), 527–533.
41. Hirose, M, Recke, A, Beckmann, T, Shimizu, A, Ishiko, A, Bieber, K, Westermann, J, Zillikens, D, Schmidt, E, & Ludwig, RJ. 2011. Repetitive immunization breaks tolerance to type XVII collagen and leads to bullous pemphigoid in mice. *J Immunol*, 187(3), 1176–1183.

42. Hirose, M, Brandolini, L, Zimmer, D, Götz, J, Westermann, J, *et al.* . 2013. The Allosteric CXCR1/2 Inhibitor DF2156A Improves Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. *J Genet Syndr Gene Ther S*, 3, 3–5.
43. Hodge, L, Black, MM, Ramnarain, N, & Bhogal, B. 1978. Indirect complement immunofluorescence in the immunopathological assessment of bullous pemphigoid, cicatricial pemphigoid, and herpes gestationis. *Clin Exp Dermatol*, 3(1), 61–67.
44. Ishii, N, Recke, A, Mihai, S, Hirose, M, Hashimoto, T, Zillikens, D, & Ludwig, RJ. 2011. Autoantibody-induced intestinal inflammation and weight loss in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Pathol*, 224(2), 234–244.
45. Ito, K, Sawamura, D, Goto, M, Nakamura, H, Nishie, W, Sakai, K, Natsuga, K, Shinkuma, S, Shibaki, A, Uitto, J, Denton, CP, Nakajima, O, Akiyama, M, & Shimizu, H. 2009. Keratinocyte-/fibroblast-targeted rescue of Col7a1-disrupted mice and generation of an exact dystrophic epidermolysis bullosa model using a human COL7A1 mutation. *Am J Pathol*, 175(6), 2508–17.
46. Janeway, CA. 2005. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 6th edn. Kapitel 4, Seite 155-165. Garland Science Publishing, a member of the Taylor & Francis Group.
47. JE, Herrero-Gonzalez, Mascaró, JM, Herrero, C, Dilling, A, Zillikens, D, & Sitaru, C. 2006. Autoantibodies from patients with BSLE inducing recruitment of leukocytes to the dermoepidermal junction and subepidermal splits in cryosections of human skin. *Arch Dermatol*, 142(11), 1513–1516.
48. Jordon, RE, Kawana, S, & Fritz, KA. 1985. Immunopathologic mechanisms in pemphigus and bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol*, 85(1), 72–78.
49. Karsten, CM, & Kohl, J. 2012. The immunoglobulin, IgG Fc receptor and complement triangle in autoimmune diseases. *Immunobiology*, 217(11), 1067–1079.
50. Karsten, CM, Pandey, MK, Figge, J, Kilchenstein, R, Taylor, PR, Rosas, M, McDonald, JU, Orr, SJ, Berger, M, Petzold, D, Blanchard, V, Winkler, A, Hess, C, Reid, DM, Majoul, IV, Strait, RT, Harris, NL, Köhl, G, Wex, E, Ludwig, RJ, Zillikens, D, Nimmerjahn, F, Finkelman, FD, Brown, GD, Ehlers, M, & Köhl, J. 2012. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of Fc γ RIIB and dectin-1. *Nat Med*, 18(9), 1401–1406.

51. Kasperkiewicz, M, Nimmerjahn, F, Wende, S, Hirose, M, Iwata, H, Jonkman, MF, Samavedam, U, Gupta, Y, Moller, S, Rentz, E, Hellberg, L, Kalies, K, Yu, Xinhua, Schmidt, Enno, Hasler, Robert, Laskay, Tamas, Westermann, Jurgen, Kohl, Jorg, Zillikens, Detlef, & Ludwig, Ralf J. 2012. Genetic identification and functional validation of Fc γ RIV as key molecule in autoantibody-induced tissue injury. *J Pathol*, 228(1), 8–19.
52. Katz, SI, Hertz, KC, & Yaoita, H. 1976. Herpes gestationis. Immunopathology and characterization of the HG factor. *J Clin Invest*, 57(6), 1434–1441.
53. Kelly, RJ, Hill, A, Arnold, LM, Brooksbank, GL, Richards, SJ, Cullen, M, Mitchell, LD, Cohen, DR, Gregory, WM, & Hillmen, P. 2011. Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood*, 117(25), 6786–6792.
54. Kemper, C, & Kohl, J. 2013. Novel roles for complement receptors in T cell regulation and beyond. *Mol Immunol*, 56(3), 181–190.
55. Kerr, MA. 1990. The structure and function of human IgA. *Biochem J*, 271(2), 285–296.
56. Kiefer, F, Brumell, J, Al-Alawi, N, Latour, S, Cheng, A, Veillette, A, Grinstein, S, & Pawson, T. 1998. The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc γ receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell Biol*, 18(7), 4209–4220.
57. Kim, JH, Kim, YH, & Kim, SC. 2011. Epidermolysis bullosa acquisita: a retrospective clinical analysis of 30 cases. *Acta Derm Venereol*, 91(3), 307–312.
58. Kim, JH, Kim, YH, Kim, S, Noh, EB, Kim, SE, Vorobyev, A, Schmidt, E, Zillikens, D, & Kim, SC. 2013. Serum levels of anti-type VII collagen antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay in patients with epidermolysis bullosa acquisita are correlated with the severity of skin lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 27(2), 224–30.
59. Kohl, J, & Gessner, JE. 1999. On the role of complement and Fc gamma-receptors in the Arthus reaction. *Mol Immunol*, 36(13-14), 893–903.
60. Komorowski, L, Müller, R, Vorobyev, A, Probst, C, Recke, A, Jonkman, MF, Hashimoto, T, Kim, SC, Groves, R, Ludwig, RJ, Zillikens, D, Stöcker, W, & Schmidt, E. 2013. Sensitive and specific assays for routine serological diagnosis of epidermolysis bullosa acquisita. *J Am Acad Dermatol*, 68(3), e89–e95.
61. Kopp, T, Sitaru, C, Pieczkowski, F, Schneeberger, A, Födinger, D, Zillikens, D, Stingl, G, & Karhofer, FM. 2006. IgA pemphigus—occurrence of anti-desmocolin 1 and anti-

- desmoglein 1 antibody reactivity in an individual patient. *J Dtsch Dermatol Ges*, 4(12), 1045–1050.
62. Kromminga, A, Scheckenbach, C, Georgi, M, Hagel, C, Arndt, R, Christophers, E, Bröcker, EB, & Zillikens, D. 2000. Patients with bullous pemphigoid and linear IgA disease show a dual IgA and IgG autoimmune response to BP180. *J Autoimmun*, 15(3), 293–300.
63. Kulkarni, S, Sitaru, C, Jakus, Z, Anderson, KE, Damoulakis, G, Davidson, K, Hirose, M, Juss, J, Oxley, D, Chessa, TAM, Ramadani, F, Guillou, H, Segonds-Pichon, A, Fritsch, A, Jarvis, GE, Okkenhaug, K, Ludwig, R, Zillikens, D, Mocsai, A, Vanhaesebroeck, B, Stephens, LR, & Hawkins, PT. 2011. PI3K β plays a critical role in neutrophil activation by immune complexes. *Sci Signal*, 4(168), ra23.
64. Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–95.
65. Lee, EH, Kim, YH, Kim, S, Kim, SE, & Kim, SC. 2012. Usefulness of Enzyme-linked Immunosorbent Assay Using Recombinant BP180 and BP230 for Serodiagnosis and Monitoring Disease Activity of Bullous Pemphigoid. *Ann Dermatol*, 24(1), 45–55.
66. Leighty, L, Li, N, Diaz, LA, & Liu, Z. 2007. Experimental models for the autoimmune and inflammatory blistering disease, Bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res*, 299(9), 417–22.
67. Liu, Z. 2004. Bullous pemphigoid: using animal models to study the immunopathology. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 9(1), 41–6.
68. Liu, Z, Diaz, LA, Troy, JL, Taylor, AF, Emery, DJ, Fairley, JA, & Giudice, GJ. 1993. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest*, 92(5), 2480–88.
69. Liu, Z, Sui, W, Zhao, M, Li, Z, Li, N, Thresher, R, Giudice, GJ, Fairley, JA, Sitaru, C, Zillikens, D, Ning, G, Marinkovich, MP, & Diaz, LA. 2008. Subepidermal blistering induced by human autoantibodies to BP180 requires innate immune players in a humanized bullous pemphigoid mouse model. *J Autoimmun*, 31(4), 331–338.
70. Ludwig, RJ. 2012. Model systems duplicating epidermolysis bullosa acquisita: a methodological review. *Autoimmunity*, 45(1), 102–10.

71. Ludwig, RJ, & Zillikens, D. 2011. Pathogenesis of epidermolysis bullosa acquisita. *Dermatol Clin*, 29(3), 493–501.
72. Ludwig, RJ, Recke, A, Bieber, K, Müller, S, de Castro Marques, A, Banczyk, D, Hirose, M, Kasperkiewicz, M, Ishii, N, Schmidt, E, Westermann, J, Zillikens, De, & Ibrahim, SM. 2011. Generation of antibodies of distinct subclasses and specificity is linked to H2s in an active mouse model of epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol*, 131(1), 167–176.
73. Ludwig, RJ, Kalies, K, Köhl, J, Zillikens, D, & Schmidt, E. 2013. Emerging treatments for pemphigoid diseases. *Trends Mol Med*, Jul, Artikel ID molmed.2013.06.003, online published.
74. Marinkovich, MP, Taylor, TB, Keene, DR, Burgeson, RE, & Zone, JJ. 1996. LAD-1, the linear IgA bullous dermatosis autoantigen, is a novel 120-kDa anchoring filament protein synthesized by epidermal cells. *J Invest Dermatol*, 106(4), 734–48.
75. Mihai, S, & Sitaru, C. 2007. Immunopathology and molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases. *J Cell Mol Med*, 11(3), 462–481.
76. Mihai, S, Chiriac, MT, Takahashi, K, Thurman, JM, Holers, VM, Zillikens, D, Botto, M, & Sitaru, C. 2007. The alternative pathway of complement activation is critical for blister induction in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Immunol*, 178(10), 6514–6521.
77. Monteiro, RC. 2007. Pathogenic role of IgA receptors in IgA nephropathy. *Contrib Nephrol*, 157, 64–79.
78. Monteiro, RC. 2010. Role of IgA and IgA Fc receptors in inflammation. *J Clin Immunol*, 30(1), 1–9.
79. Monteiro, RC, & Van De Winkel, JGJ. 2003. IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol*, 21, 177–204.
80. Mutasim, DF. 2000. Levels of antibodies to BP180 correlate with disease activity in bullous pemphigoid. *Arch Dermatol*, 136(2), 253–4.
81. Nakajima, K. 2012. Recent advances in dermatitis herpetiformis. *Clin Dev Immunol*, 2012, Artikel ID 914162, online published.
82. Nanda, A, Dvorak, R, Al-Saeed, K, Al-Sabah, H, & Alsaleh, QA. 2004. Spectrum of autoimmune bullous diseases in Kuwait. *Int J Dermatol*, 43(12), 876–81.

83. Nishie, W, Sawamura, D, Goto, M, Ito, K, Shibaki, A, McMillan, JR, Sakai, K, Nakamura, H, Olasz, E, Yancey, KB, Akiyama, M, & Shimizu, H. 2007. Humanization of autoantigen. *Nat Med*, 13(3), 378–83.
84. Nishie, W, Kiritsi, D, Nystrom, A, Hofmann, SC, & Bruckner-Tuderman, L. 2011. Dynamic interactions of epidermal collagen XVII with the extracellular matrix: laminin 332 as a major binding partner. *Am J Pathol*, 179(2), 829–837.
85. Novak, J, Renfrow, MB, Gharavi, AG, & Julian, BA. 2013. Pathogenesis of immunoglobulin A nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 22(3), 287–294.
86. Olaru, F, Mihai, S, Petrescu, I, Zillikens, D, & Sitaru, C. 2006. Generation and characterization of monoclonal antibodies against the intracellular domain of hemidesmosomal type XVII collagen. *Hybridoma (Larchmt)*, 25(3), 158–162.
87. Oyama, N, Setterfield, JF, Powell, AM, Sakuma-Oyama, Y, Albert, S, Bhogal, BS, Vaughan, RW, Kaneko, F, Challacombe, SJ, & Black, MM. 2006. 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*, 154(1), 90–8.
88. Pasquier, B, Launay, P, Kanamaru, Y, Moura, IC, Pfirsch, S, Ruffié, C, Hénin, D, Benhamou, M, Pretolani, M, Blank, U, & Monteiro, RC. 2005. Identification of Fc α RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcR γ ITAM. *Immunity*, 22(1), 31–42.
89. Pohla-Gubo, G, & Hintner, H. 2011. Direct and indirect immunofluorescence for the diagnosis of bullous autoimmune diseases. *Dermatol Clin*, 29(3), 365–72.
90. Recke, A, Sitaru, C, Vidarsson, G, Evensen, M, Chiriac, MT, Ludwig, RJ, & Zillikens, D. 2010. Pathogenicity of IgG subclass autoantibodies to type VII collagen: induction of dermal-epidermal separation. *J Autoimmun*, 34(4), 435–444.
91. Recke, A, Shimanovich, I, Steven, P, Westermann, L, Zillikens, D, & Schmidt, E. 2011. Treatment-refractory anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid. Remission following adjuvant immunoadsorption and rituximab. *Hautarzt*, 62(11), 852–858.
92. Remington, J, Chen, M, Burnett, J, & Woodley, DT. 2008. Autoimmunity to type VII collagen: epidermolysis bullosa acquisita. *Curr Dir Autoimmun*, 10, 195–205.

93. Roos, A, Bouwman, LH, van Gijlswijk-Janssen, DJ, Faber-Krol, MC, Stahl, GL, & Daha, MR. 2001. Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J Immunol*, 167(5), 2861–2868.
94. Rose-John, S. 2012. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci*, 8(9), 1237–1247.
95. Saleh, M A, Ishii, K, Kim, YJ, Murakami, A, Ishii, N, Hashimoto, T, Schmidt, E, Zillikens, D, Shirakata, Y, Hashimoto, K, Kitajima, Y, & Amagai, M. 2011. Development of NC1 and NC2 domains of type VII collagen ELISA for the diagnosis and analysis of the time course of epidermolysis bullosa acquisita patients. *J Dermatol Sci*, 62(3), 169–75.
96. Samavedam, UKSRL, Kalies, K, Scheller, J, Sadeghi, H, Gupta, Y, Jonkman, MF, Schmidt, E, Westermann, J, Zillikens, D, Rose-John, S, & Ludwig, RJ. 2013. Recombinant IL-6 treatment protects mice from organ specific autoimmune disease by IL-6 classical signalling-dependent IL-1ra induction. *J Autoimmun*, 40(Feb), 74–85.
97. Sandin, C, Linse, S, Areschoug, T, Woof, JM, Reinholdt, J, & Lindahl, G. 2002. Isolation and detection of human IgA using a streptococcal IgA-binding peptide. *J Immunol*, 169(3), 1357–1364.
98. Sárdy, M, Kárpáti, S, Merkl, B, Paulsson, M, & Smyth, N. 2002. Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J Exp Med*, 195(6), 747–757.
99. Scheller, J, Ohnesorge, N, & Rose-John, S. 2006. Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. *Scand J Immunol*, 63(5), 321–329.
100. Schmidt, E, & Zillikens, D. 2010. Immunoabsorption in dermatology. *Arch Dermatol Res*, 302(4), 241–253.
101. Schmidt, E, & Zillikens, D. 2013. Pemphigoid diseases. *Lancet*, 381(9863), 320–332.
102. Schmidt, E, Reimer, S, Kruse, N, Jainta, S, Brocker, EB, Marinkovich, MP, Giudice, GJ, & Zillikens, D. 2000a. Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 115(5), 842–848.
103. Schmidt, E, Bröcker, EB, & Zillikens, D. 2000b. Pemphigus. Loss of desmosomal cell-cell contact. *Hautarzt*, 51(5), 309–18.

104. Schmidt, E, Obe, K, Bröcker, EB, & Zillikens, D. 2000c. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol*, 136(2), 174–8.
105. Schmidt, E, Skrobek, C, Kromminga, A, Hashimoto, T, Messer, G, Bröcker, EB, Yancey, KB, & Zillikens, D. 2001. Cicatricial pemphigoid: IgA and IgG autoantibodies target epitopes on both intra- and extracellular domains of bullous pemphigoid antigen 180. *Br J Dermatol*, 145(5), 778–83.
106. Schmidt, E, Klinker, E, Opitz, A, Herzog, S, Sitaru, C, Goebeler, M, Taleghoni, B M, Bröcker, EB, & Zillikens, D. 2003. Protein A immunoabsorption: a novel and effective adjuvant treatment of severe pemphigus. *Br J Dermatol*, 148(6), 1222–1229.
107. Schmidt, E, della Torre, R, & Borradori, L. 2012. Clinical features and practical diagnosis of bullous pemphigoid. *Immunol Allergy Clin North Am*, 32(2), 217–32.
108. Sesarman, A, Mihai, S, Chiriac, MT, Olaru, F, Sitaru, AG, Thurman, JM, Zillikens, D, & Sitaru, C. 2008. Binding of avian IgY to type VII collagen does not activate complement and leucocytes and fails to induce subepidermal blistering in mice. *Br J Dermatol*, 158(3), 463–471.
109. Shimanovich, I, Mihai, S, Oostingh, GJ, TIlenchuk, Bröcker, EB, Opdenakker, G, Zillikens, D, & Sitaru, C. 2004. 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*, 204(5), 519–527.
110. Shimizu, H, Masunaga, T, Ishiko, A, Kikuchi, A, Hashimoto, T, & Nishikawa, T. 1995. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera show an inversely graded binding pattern to extracellular regions of desmosomes in different layers of human epidermis. *J Invest Dermatol*, 105(2), 153–9.
111. Sitaru, C, & Zillikens, D. 2005. Mechanisms of blister induction by autoantibodies. *Exp Dermatol*, 14(12), 861–875.
112. Sitaru, C, Schmidt, E, Petermann, S, Munteanu, LS, Bröcker, EB, & Zillikens, D. 2002a. Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *J Invest Dermatol*, 118(4), 664–671.
113. Sitaru, C, Kromminga, A, Hashimoto, T, Bröcker, EB, & Zillikens, D. 2002b. Autoantibodies to type VII collagen mediate Fc γ -dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *Am J Pathol*, 161(1), 301–311.

114. Sitaru, C, Goebeler, M, & Zillikens, D. 2004. Bullous autoimmune dermatoses (I): Pathogenesis and diagnosis. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2(2), 123–8.
115. Sitaru, C, Mihai, S, Otto, C, Chiriac, MT, Hausser, I, Dotterweich, B, Saito, H, Rose, C, Ishiko, A, & Zillikens, D. 2005. Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *J Clin Invest*, 115(4), 870–878.
116. Sitaru, C, Chiriac, MT, Mihai, S, Büning, J, Gebert, A, Ishiko, A, & Zillikens, D. 2006. Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in sub-epidermal blistering in mice. *J Immunol*, 177(5), 3461–3468.
117. Skaria, M, Jaunin, F, Hunziker, T, Riou, S, Schumann, H, Bruckner-Tuderman, L, Hertl, M, Bernard, P, Saurat, J H, Favre, B, & Borradori, L. 2000. IgG autoantibodies from bullous pemphigoid patients recognize multiple antigenic reactive sites located predominantly within the B and C subdomains of the COOH-terminus of BP230. *J Invest Dermatol*, 114(5), 998–1004.
118. Skokowa, J, Ali, SR, Felda, O, Kumar, V, Konrad, S, Shushakova, N, Schmidt, RE, Piekorz, RP, Nurnberg, B, Spicher, K, Birnbaumer, L, Zwirner, J, Claassens, JWC, Verbeek, JS, van Rooijen, N, Kohl, J, & Gessner, JE. 2005. Macrophages induce the inflammatory response in the pulmonary Arthus reaction through G alpha i2 activation that controls C5aR and Fc receptor cooperation. *J Immunol*, 174(5), 3041–3050.
119. Stanley, JR, Hawley-Nelson, P, Yuspa, SH, Shevach, EM, & Katz, SI. 1981. Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell*, 24(3), 897–903.
120. Suzuki, H, Kiryluk, K, Novak, J, Moldoveanu, Z, Herr, AB, Renfrow, MB, Wyatt, RJ, Scolari, F, Mestecky, J, Gharavi, AG, & Julian, BA. 2011. The pathophysiology of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 22(10), 1795–803.
121. Tampoia, M, Giavarina, D, Di Giorgio, C, & Bizzaro, N. 2012. Diagnostic accuracy of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) to detect anti-skin autoantibodies in autoimmune blistering skin diseases: a systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev*, 12(2), 121–6.
122. Terra, JB, Meijer, JM, Jonkman, MF, & Diercks, GFH. 2013. The n- vs. u-serration is a learnable criterion to differentiate pemphigoid from epidermolysis bullosa acquisita in direct immunofluorescence serration pattern analysis. *Br J Dermatol*, 169(1), 100–105.

123. Tsuruta, D, Ishii, N, Hamada, T, Ohyama, B, Fukuda, S, Koga, H, Imamura, K, Kobayashi, H, Karashima, T, Nakama, T, Dainichi, T, & Hashimoto, T. 2011. IgA pemphigus. *Clin Dermatol*, 29(4), 437–442.
124. Tsuruta, D, Ishii, N, & Hashimoto, T. 2012. Diagnosis and treatment of pemphigus. *Immunotherapy*, 4(7), 735–45.
125. Ujiie, H, Shibaki, A, & Nishie, Wand Shimizu, H. 2010. What's new in bullous pemphigoid. *J Dermatol*, 37(3), 194–204.
126. Ujiie, Hideyuki, Shibaki, Akihiko, Nishie, Wataru, Shinkuma, Satoru, Moriuchi, Reine, Qiao, Hongjiang, & Shimizu, Hiroshi. 2012. Noncollagenous 16A domain of type XVII collagen-reactive CD4+ T cells play a pivotal role in the development of active disease in experimental bullous pemphigoid model. *Clin Immunol*, 142(2), 167–75.
127. van de Winkel, JG, & Capel, PJ. 1993. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today*, 14(5), 215–221.
128. van der Steen, L, Tuk, CW, Bakema, JE, Kooij, G, Reijerkerk, A, Vidarsson, G, Bouma, G, Kraal, G, de Vries, HE, Beelen, RHJ, & van Egmond, M. 2009. Immunoglobulin A: Fc α RI interactions induce neutrophil migration through release of leukotriene B4. *Gastroenterology*, 137(6), 2018–29.
129. van der Steen, LP, Bakema, JE, Sesarman, A, Florea, F, Tuk, CW, Kirtschig, G, Hage, JJ, Sitaru, C, & van Egmond, M. 2012. Blocking Fc α receptor I on granulocytes prevents tissue damage induced by IgA autoantibodies. *J Immunol*, 189(4), 1594–1601.
130. van Egmond, M, van Vuuren, AJ, Morton, HC, van Spriël, AB, Shen, L, Hofhuis, FM, Saito, T, Mayadas, TN, Verbeek, JS, & van de Winkel, JG. 1999. Human immunoglobulin A receptor (Fc α RI, CD89) function in transgenic mice requires both FcR γ chain and CR3 (CD11b/CD18). *Blood*, 93(12), 4387–4394.
131. Venugopal, SS, & Murrell, DF. 2012. Diagnosis and clinical features of pemphigus vulgaris. *Immunol Allergy Clin North Am*, 32(2), 233–43.
132. Vodegel, RM, de Jong, MCJM, Pas, HH, & Jonkman, MF. 2002. IgA-mediated epidermolysis bullosa acquisita: two cases and review of the literature. *J Am Acad Dermatol*, 47(6), 919–25.
133. Wang, X, Ghasri, P, Amir, M, Hwang, B, Hou, Y, Khilili, M, Lin, A, Keene, D, Uitto, J, Woodley, DT, & Chen, M. 2013. Topical Application of Recombinant Type VII Collagen

Incorporates Into the Dermal-Epidermal Junction and Promotes Wound Closure. *Mol Ther*, 21(7), 1335–1344.

134. Wheeler, GN, Parker, AE, Thomas, CL, Ataliotis, P, Poynter, D, Arnemann, J, Rutman, AJ, Pidsley, SC, Watt, FM, & Rees, DA. 1991. Desmosomal glycoprotein DGI, a component of intercellular desmosome junctions, is related to the cadherin family of cell adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(11), 4796–800.
135. Wikimedia. 2013. Cartoon of an antibody. Yohan, <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:AntibodyChains.svg> (Zugriff: 27.07.2013).
136. Wojnarowska, F, Marsden, RA, Bhogal, B, & Black, MM. 1988. Chronic bullous disease of childhood, childhood cicatricial pemphigoid, and linear IgA disease of adults. A comparative study demonstrating clinical and immunopathologic overlap. *J Am Acad Dermatol*, 19(5 Pt 1), 792–805.
137. Wong, S N, & Chua, S H. 2002. Spectrum of subepidermal immunobullous disorders seen at the National Skin Centre, Singapore: a 2-year review. *Br J Dermatol*, 147(3), 476–80.
138. Woodley, DT, Burgeson, RE, Lunstrum, G, Bruckner-Tuderman, L, Reese, MJ, & Briggaman, RA. 1988. Epidermolysis bullosa acquisita antigen is the globular carboxyl terminus of type VII procollagen. *J Clin Invest*, 81(3), 683–687.
139. Woodley, DT, Chang, C, Saadat, P, Ram, R, Liu, Z, & Chen, M. 2005. Evidence that anti-type VII collagen antibodies are pathogenic and responsible for the clinical, histological, and immunological features of epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol*, 124(5), 958–964.
140. Woodley, DT, Ram, R, Doostan, A, Bandyopadhyay, P, Huang, Y, Remington, J, Hou, Y, Keene, DR, Liu, Z, & Chen, M. 2006. Induction of epidermolysis bullosa acquisita in mice by passive transfer of autoantibodies from patients. *J Invest Dermatol*, 126(6), 1323–1330.
141. Yu, X, Holdorf, K, Kasper, B, Zillikens, D, Ludwig, RJ, & Petersen, F. 2010. Fc γ RIIA and Fc γ RIIIB are required for autoantibody-induced tissue damage in experimental human models of bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol*, 130(12), 2841–2844.
142. Zhang, W, Bi, B, Oldroyd, RG, & Lachmann, PJ. 2000. Neutrophil lactoferrin release induced by IgA immune complexes differed from that induced by cross-linking of Fc α receptors (Fc α R) with a monoclonal antibody, MIP8a. *Clin Exp Immunol*, 121(1), 106–11.

143. Zhang, X, Schmudde, I, Laumonnier, Y, Pandey, MK, Clark, JR, Konig, P, Gerard, NP, Gerard, C, Wills-Karp, M, & Kohl, J. 2010. A critical role for C5L2 in the pathogenesis of experimental allergic asthma. *J Immunol*, 185(11), 6741–6752.
144. Zhao, M, Trimbeger, ME, Li, N, Diaz, LA, Shapiro, SD, & Liu, Z. 2006. Role of FcRs in animal model of autoimmune bullous pemphigoid. *J Immunol*, 177(5), 3398–405.
145. Zillikens, D, Kawahara, Y, Ishiko, A, Shimizu, H, Mayer, J, Rank, CV, Liu, Z, Giudice, GJ, Tran, HH, Marinkovich, MP, Brocker, EB, & Hashimoto, T. 1996. A novel subepidermal blistering disease with autoantibodies to a 200-kDa antigen of the basement membrane zone. *J Invest Dermatol*, 106(6), 1333–1338.
146. Zillikens, D, Rose, PA, Balding, SD, Liu, Z, Olague-Marchan, M, Diaz, LA, & Giudice, GJ. 1997. Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. *J Invest Dermatol*, 109(4), 573–9.
147. Zillikens, D, Herzele, K, Georgi, M, Schmidt, E, Shimanovitch, I, Schumann, H, Mascaro, JM, Diaz, LA, Bruckner-Tuderman, L, Bröcker, EB, & Giudice, GJ. 1999. Autoantibodies in a subgroup of patients with linear IgA disease react with the NC16A domain of BP180. *J Invest Dermatol*, 113(6), 947–53.
148. Zone, JJ, Taylor, TB, Kadunce, DP, & Meyer, LJ. 1990. Identification of the cutaneous basement membrane zone antigen and isolation of antibody in linear immunoglobulin A bullous dermatosis. *J Clin Invest*, 85(3), 812–20.
149. Zone, JJ, Egan, CA, Taylor, TB, & Meyer, LJ. 2004. IgA autoimmune disorders: development of a passive transfer mouse model. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 9(1), 47–51.

7 Anhang

7.1 Verwendete Materialien

Ammoniakwasser	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
biotinylierte monoklonale Maus-anti-Mensch-IgA1- bzw. IgA2-Antikörper	Nordic Laboratories, Kopenhagen, Dänemark
1% biotinfreies BSA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BSA-PBS-T	1% biotinfreies BSA und PBS mit 0,1% Tween-20
BenchMark Protein Ladder Marker	invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Blockingpuffer	PBS mit 1% biotinfreiem BSA und 0,05% Tween
Carbonatpuffer	3 g NaHCO ₃ , 1,59 g Na ₂ CO ₃ , Aqua bidest. ad 1000 ml; pH 9,6
Chemilumineszenz-Medium	CL-Medium, RPMI-1640 ohne Phenolrot mit stabilisiertem L-Glutamin mit 25 mM HEPES, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Coomassie-Brillant-Blue (R250) Färbelösung	2 g/l Coomassie-Brillant-Blue R250, 450 ml Methanol, 100 ml Essigsäure 100% ad 1000 ml ddH ₂ O)
Cryomolds Tissue-Tek Cryomold	Sakura Finetec Inc., Torrance, USA
Dako Pen Ölstift	DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark

Dextranlösung	Dextran 500, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DyLight Amine-Reactive Fluors, DyLight 488 NHS Ester	Thermo Scientific, Waltham, USA
Entfärbelösung SDS-Gele	450 ml Methanol, 100 ml Essigsäure 100% ad 1000 ml ddH ₂ O
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure-Alkohol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FITC-konjugierte polyklonale Ziege-anti-Mensch-IgA-Antikörper	BioRad, München, Deutschland, Produktnummer 30240C
FITC-konjugierte polyklonale Ziege-anti-Mensch-IgG-Antikörper	Sigma-Aldrich, Gillingham, Großbritannien, Produktnummer F-5512
FITC-konjugiertes Streptavidin	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Detschland
Glycerin	Propan-1,2,3-triol
Halbmedium	RPMI 1640 verdünnt mit LPS-freiem ddH ₂ O im Verhältnis 1:1
Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Heparin	Heparin-Natrium 25.000 I.E./ml, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Hexa-Lösung	5% Hexadecyltrimethyl-ammoniumbromid in ddH ₂ O
hCOL7EF-Fragment	Konz. 0,7 mg/ml

Luminol	5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Luminol-Lösung	2 mg/2 ml Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion), in 1 ml ddH ₂ O plus 8 µl NaOH
Lysepuffer	D-PBS (LPS-frei) verdünnt mit LPS-freiem ddH ₂ O im Verhältnis 1:5
NaCl	Natriumchlorid, J.T. Baker, Deventer, Holland
Objekträger SuperFrost/Plus	Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Nitrozellulosemembranen	Autoimmunlabor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie
PBS	8 g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ , K ₂ HPO ₄ in ddH ₂ O
PBS-T	0,1% Tween-20 in PBS
Peroxidase-konjugierte polyklonale Kaninchen-anti-Mensch-IgA-Antikörper	DAKOCytomation, Hamburg, Deutschland, Produktnummer PO216
Polymorphprep	Fresenius Kabi Norge AS, Oslo, Norwegen
RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin	BioWhittaker, Verviers Belgien
SDS Probenpuffer	60 mM Tris-HCl, pH 6,8; 3% w/v SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat); 0,003 % w/v Bromphenolblau; 10 % v/v Glycerin; 50 mM β-Mercaptoethanol (nur bei reduzierender SDS-PAGE) in ddH ₂ O
Sodumborat Puffer	pH 8,5, Labor UKSH Campus Lübeck
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder Marker	Fermentas, Vilnius, Lithuania

Tissue-Tek O.C.T. Compound
Einbettmedium

Sakura Finetek Inc., Torrance, USA

TMB

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

Trypanblau

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,
Deutschland

Tween-20

Polyoxyethylenesorbitan monolaurate,
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,
Deutschland, Produktnummer 1379

Waschpuffer

PBS mit 0,05% Tween

Xylol

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,
Deutschland

7.2 Verwendete Laborgeräte

Begasungsbrutschrank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Butterflykanüle	BD Valu Set, Beckton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
ELISA-Washer	Columbus Pro, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Eppendorfgefäß	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Feuchtkammer	Werner Hassa GmbH, Lübeck, Deutschland
Glaseindeckautomaten	Leica CV 5030, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kryostat Leica CM 3050 S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop	Wilovert S, Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland und Olympus BX40, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mini-Protean 3 Cell Gel-Kassette	BioRad, München, Deutschland
Monovette EDTA	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg Deutschland
Parafilm	Parafilm M Laboratory Film, Pechiney Plastic Packaging, Menasha, Wisconsin, USA
Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland

Schütteltisch	TPM 4, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Tischzentrifuge Festwinkelrotor #3328	Haereus Instruments GmbH, Haunau, Deutschland
<i>Tubes</i> (Plastikreaktionsröhrchen) 9ml/ 15 ml/ 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Varifuge	1.0 R, Heraeus Istruments, GmbH, Hanau, Deutschland
VICTOR3-Reader	Perkin-Elmer, Waltham, USA
Zeba Spin Desalting Columns, 7 K MWCO	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

8 Publikation

Andreas Recke, Luisa M. Trog, Hendri H. Pas, Artem Vorobyev, Aida Abadpour, Marcel F. Jonkman, Ger van Zandbergen, Claudia Kauderer, Detlef Zillikens, Gestur Vidarsson, Ralf J. Ludwig:

Recombinant Human IgA1 and IgA2 Autoantibodies to Type VII Collagen Induce Subepidermal Blistering Ex Vivo, *The Journal of Immunology*, 2014 Aug 15; 193(4):1600-8; doi:10.4049/jimmunol.1400160

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. D. Zillikens sowohl für die Möglichkeit der Durchführung meiner Arbeit an der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck als auch für die Bereitstellung der Laboratorien und Materialien zur Durchführung der Experimente.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ludwig für die Überlassung des Themas, sowie seine Hilfe und Unterstützung und seine vielen Anregungen während der experimentellen und schriftlichen Phase zur Erstellung dieser Arbeit.

Ganz besonders danken möchte ich dem Betreuer meiner Arbeit, Herrn Dr. med. Andreas Recke, der mir die gesamte Zeit mit Rat und Tat bei allen auftretenden Problemen zur Seite stand und stets ein offenes Ohr und motivierende Worte für mich hatte.

Mein herzlicher Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Autoimmunität für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, vor allem Rebecca Cames und Claudia Kauderer. Besonders bedanken möchte ich mich bei Miriam Freitag und Martin Hänsel für die Einarbeitung in die Methodik.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei den Patienten und Blutspendern, welche mir durch ihre Hilfsbereitschaft die Durchführung der Untersuchungen ermöglicht haben.

Mein herzlichster Dank gilt meiner lieben Familie, die während meiner gesamten Studienzeit und Fertigstellung dieser Arbeit immer für mich da war und mich stets unterstützt und ermutigt hat. Von ganzem Herzen danke ich hierbei meinem Opa Dr. Friedrich Kampe, der mir mit seiner Zielstrebigkeit immer ein Vorbild war.

Ganz besonders und aus tiefstem Herzen möchte ich aber meiner Mutter Ulrike Trog danken, die mich in den letzten zwei Wochen der Fertigstellung so großartig und liebevoll unterstützt hat.

Lebenslauf



Persönliche Daten

Name Luisa Trog
Geburtsdatum 28.03.1984
Geburtsort Magdeburg
Familienstand ledig
Konfession evangelisch

Beruflicher Werdegang

seit 15.09.2010 Weiterbildungsassistentin in der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Klinikdirektor Prof. Dr. med. D. Zillikens

Dissertation

01.09.2010 - 31.08.2011 Durchführung der Experimente: Forschungslabor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, Universität zu Lübeck

01.09.2011 - 20.06.2013 Verfassung der Arbeit

Juli 2013 Fertigstellung der Arbeit

Hochschulausbildung

2003 – 2010 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
Mai 2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: gut (2,5)
März 2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: gut (2,5)

Praktisches Jahr

05.10.2009 – 22.01.2010 Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
15.06. – 02.10.2009 Abteilung für Chirurgie, Sana Kliniken Ostholstein, Eutin
23.02. – 12.06.2009 Abteilung für Innere Medizin, Asklepios Klinik, Bad Oldesloe

Famulaturen

17.09. – 15.10.2008 Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
18.02. – 09.03.2008 Praxis für Pädiatrie Dr. med. E. De Bary, Lübeck
14.02. – 07.03.2007 Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Klinikum Ibbenbüren
28.08. – 01.10.2006 Praxis für Allgemeinmedizin und Naturheilverfahren U. Trog, Wienhausen

Schulbildung

1996 – 2003	Gymnasium Ernestinum, Celle Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,6 Leistungskurse: Biologie, Mathematik Prüfungskurse: Deutsch, Geschichte
1994 – 1996	Orientierungsstufe Schulzentrum Burgstraße, Celle
1993 – 1994	Grundschule, Wienhausen
1990 – 1993	Grundschule, Altencelle

Lübeck, 28.07.2013