

Aus der Klinik für Dermatologie der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. D. Zillikens

**Häufigkeit von Pemphigoid- und Pemphigus-
Autoantikörpern und Überlappung verschiedener
Autoantikörper in gesunden Blutspendern**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Wiebke Prüßmann

aus Erfurt

Lübeck 2015

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Ralf Ludwig
2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Peter Lamprecht
Tag der mündlichen Prüfung: 12.06.2015
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.06.2015

Promotionskommission der Sektion Medizin

Abkürzungen

AAK	Autoantikörper
adj. P	adjustierter p-Wert
AIBD	Bullöse Autoimmundermatose
AK	Antikörper
AMA-2	Anti-Mitochondriales Antigen 2
ANA	Antinukleäre Antikörper
ANCA	Anti-Neutrophilen cytoplasmatische Antikörper
AV-Block	Atrioventrikulärer Block
BALBc	Albino Mauslinie
Bcl-2	B-cell lymphoma Protein 2
BP	Bullöses Pemphigoid
BP180	Bullöses Pemphigoid Antigen 2, 180 kDa
BP230	Bullöses Pemphigoid Antigen 1, 230 kDa
°C	Grad Celsius
C3	Komplementfaktor 3
cANCA	cytoplasmatischer Anti-Neutrophilen cytoplasmatischer Antikörper
CCP	Citrulliniertes C-Peptid
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Zytomegalie-Virus
COL17	Kollagen Typ XVII
DEJ	Dermo-epidermale Junktionszone
Dsc1	Desmocollin 1
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
Dsg1	Desmoglein 1
Dsg3	Desmoglein 3
Dsg4	Desmoglein 4
E. coli	Escherichia coli
EBA	Epidermolysis bullosa aquisita
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EC	Extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fc	kristallisierbares Fragment des Antikörpers

FITC	Fluorescein
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HaCaT	Humane Keratinozyten Zelllinie (human adult low calcium temperature keratinocytes)
HEK293	Humane epitheliale Zellreihe 293
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HSP	Hitzeschockprotein
Ig	Immunglobulin
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
Jo-1	Histidyl-t-RNA-Synthetase
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
M	Molare Masse
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
ml	Milliliter
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase 9
MPO	Myeloperoxidase
N	Anzahl getesteter Proben
n	Anzahl positiver Proben
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NC16A	16. nicht-kollagenöse Domäne von BP180
NE	Neutrophilen Elastase
OR	Odds Ratio
p	p-Wert
p53	Protein 53
pANCA	perinukleärer Anti-Neutrophilen cytoplasmatischer Antikörper
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCA	Perniziöse Anämie
pH	pH-Wert
PL-12	Alanyl-tRNA-Synthetase
PL-7	Threonyl-tRNA-Synthetase

PMN	Polymorphkerniger Leukozyt, Neutrophiler Granulozyt
PPW	Positiv prädiktiver Wert
PR3	Proteinase 3
RA	Rheumatoide Arthritis
Rag2 ^{-/-}	immundefiziente Mauslinie
RE	Relative Einheiten
ROS	reactive oxygen species
s	Sekunden
SE	Standardfehler
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SNP	single nucleotide polymorphism
SS-A	Sjögren Antigen A
SS-B	Sjögren Antigen B
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
TCR	T-Zell Rezeptor
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TPO	Thyreoperoxidase
TSH	Thyreo-stimulierendes Hormon
μl	Microliter
VZV	Varizella-Zoster-Virus

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Autoimmunität	1
1.1.1	Selbsttoleranz	1
1.1.2	Autoantikörper	2
1.2	Autoimmunkrankheiten	4
1.2.1	Definition	4
1.2.2	Klassifikation	5
1.2.3	Gemeinsames Auftreten verschiedener Autoimmunkrankheiten	5
1.3	Bullöse Autoimmundermatosen	6
1.3.1	Epidemiologie	6
1.3.2	Zielantigene	7
1.3.3	Pathophysiologie	10
1.3.3.1	Bullöses Pemphigoid	10
1.3.3.2	Pemphigus	11
1.3.4	Klinik	14
1.3.4.1	Bullöses Pemphigoid	14
1.3.4.2	Pemphigus	15
1.3.5	Diagnostik	16
1.3.5.1	Histopathologie	16
1.3.5.2	Direkte Immunfloreszenz	17
1.3.5.3	Indirekte Immunfluoreszenz	18
1.3.5.4	Bestimmung der Zielantigene	19
1.4	Entwicklung der Zielstellungen	20
1.4.1	Ziele der Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Ethik	21
2.2	Blutproben	21
2.3	Prinzip der Indirekten Immunfluoreszenz	22
2.4	Autoantikörper gegen Hautstrukturproteine	22
2.4.1	Screening mittels Indirektem Immunfluoreszenz Assay	22
2.4.2	Evaluation mittels ELISA	24
2.5	Analyse der Überlappung verschiedener krankheitsspezifischer Autoantikörper	27
2.5.1	Anti-CCP-Antikörper	28
2.5.2	Autoantikörper gegen endokrine Organe	29

2.5.3	ANCA.....	30
2.5.4	Vergleich Autoantikörperprävalenz mit publizierter Krankheitsprävalenz...	31
2.6	Statistik.....	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Häufigkeit von Pemphigus- und Pemphigoid assoziierten Autoantikörpern in Gesunden.....	33
3.1.1	Indirekte Immunfluoreszenz	33
3.1.2	ELISA.....	34
3.2	Prävalenz weiterer getesteter Autoantikörper in Gesunden	35
3.2.1	Prävalenzvergleich von Autoantikörpern und zugehörigen Erkrankungen ..	37
3.3	Kookkurrenz von ANA und anderen Autoantikörpern in Gesunden.....	38
4	Diskussion	40
4.1	Blutspender	40
4.1.1	Gesundheitsstatus	40
4.1.2	Soziodemographische Eigenschaften	41
4.2	Pemphigus- und Pemphigoid assoziierte Autoantikörper sind niedrigprävalent in Gesunden nachweisbar	42
4.2.1	Unterschiede zwischen Indirekter Immunfluoreszenz und ELISA	42
4.2.2	Progredienz zur Krankheitsmanifestation	44
4.2.3	Mutmaßliche Unterschätzung der Prävalenz durch hohes Erkrankungsalter	45
4.2.4	Vergleich zu bisher publizierten Häufigkeiten	45
4.2.5	Pathogenität der Pemphigus- und Pemphigoid-Antikörper	47
4.2.5.1	Plasmakonzentration	47
4.2.5.2	Antikörperklassen und -subklassen	48
4.2.5.3	Epitope	49
4.2.5.4	Affinität und Avidität.....	50
4.3	Gesunde tragen häufig krankheitsspezifische Autoantikörper	51
4.3.1	Persistenz der Autoantikörper in Gesunden	52
4.3.2	Natürliche Autoantikörper.....	53
4.3.3	Glykosylierung von Autoantikörpern.....	54
4.3.4	Autoantikörper finden sich häufiger als die Krankheitsprävalenz	56
4.3.5	Einfluss von Alter und Geschlecht auf Autoantikörper in Gesunden	57
4.4	Verschiedene krankheitsspezifische Autoantikörper überlappen in Gesunden	58
5	Zusammenfassung	61

6	Literaturverzeichnis.....	63
7	Anhang.....	77
7.1	Votum der Ethikkommission	77
7.2	Ergänzende Abbildungen.....	77
7.3	Ausschlusskriterien für Blutspender.....	79
	Danksagung	83
	Lebenslauf	84
	Veröffentlichungen.....	85
	Kongressbeiträge.....	86

1 Einleitung

1.1 Autoimmunität

Autoreaktivität, Autotoxizität, Autoaggression - viele verschiedene Begrifflichkeiten werden mit dem Zustand der pathologischen Autoimmunität, der Erkrankung an Autoimmunkrankheiten, in Verbindung gebracht. Dabei ist eine saubere Trennung jener Begriffe vom ausschließlich Krankhaften wichtig. So ist Autoreaktivität eine physiologisch notwendige, wenngleich auch manchmal pathologische Eigenschaft, deren Übergang ineinander bis heute nicht gänzlich verstanden wird [21, 75, 105].

1.1.1 Selbsttoleranz

Um eine krankhafte Ausrichtung des Immunsystems gegen das Selbst zu verhindern, existieren verschiedene Toleranzstrategien, welche hier nur kurz angerissen werden sollen. Noch im primären Immunorgan, also im Knochenmark oder im Thymus, werden unreife Immunozyten, welche Antigene des Selbst mit hoher Affinität erkennen, durch negative Signalgebung inaktiviert und sterben durch Apoptose ab [84, 103]. Interessanterweise werden dabei eine Vielzahl, wenn auch nicht alle, körpereigenen Antigene, wie z.B. Insulin, im Thymusmark durch spezialisierte dendritische Zellen ektopisch exprimiert [73, 84, 103]. Diesen Mechanismus, der auf der klonalen Selektionstheorie von Burnet (aus den Jahren 1957-59) basiert [117], bezeichnet man als zentrale Toleranz.

Dennoch finden sich Unmengen naiver niedrigaffiner autoreaktiver T- und B-Zellen im Blut und den peripheren Organen, ohne pathologische Effektorreaktionen auszulösen [125]. Zu den wichtigsten Mechanismen der peripheren Toleranz zählen: Anergie, das Nichtreagieren auf Antigene bei fehlender Aktivierung der naiven Immunozyten durch proinflammatorische Cytokine oder costimulierende Faktoren der antigenpräsentierenden Zelle, Suppression durch regulatorische T-Zellen, funktionelle Umlenkung durch Induktion der Differenzierung zu Regulator- anstatt Effektor-T-Zellen sowie Deletion durch Aktivitätsinduzierte Apoptose der autoreaktiven Immunozyten [73]. Ein gewisses Ausmaß der Autoreaktivität ist dabei unerlässlich für die normale Abwehrfunktion des Immunsystems gegenüber Infektionen oder entarteten Körperzellen [125]. Nur bei Kombination aus genetischer Anfälligkeit (z.B. in Abhängigkeit des HLA Serotyps), anstoßenden Umweltfaktoren (z.B. Virusinfektionen, Rauchen) und Ausfall mehrerer dieser Toleranzstrategien kann es dauerhaft zur krankhaften Autoimmunität kommen [125].

1.1.2 Autoantikörper

Autoantikörper sind Immunglobuline, welche sich gegen körpereigene Antigene richten und sowohl in Patienten mit Autoimmunerkrankungen als auch Gesunden gefunden werden können [105]. Bisher wurden Autoantikörper der Klassen IgM, IgG, IgA und IgE beschrieben [125].

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Eigenschaften dieser Antikörperklassen nur kurz zusammengefasst [125, 193]: Die zuerst während der humoralen Immunantwort sezernierten IgM Antikörper bilden Pentamere und können die Blutbahn aufgrund ihrer Größe (970 kDa) kaum verlassen. Sie weisen meist eine niedrige Affinität auf, sind jedoch sehr gute Aktivator des Komplementsystems. IgG, IgA und IgE Antikörper sind deutlich kleiner und können aus dem Blut in das Gewebe diffundieren. Nach Ablauf der somatischen Hypermutation, der vielfachen Punktmutationen innerhalb der variablen Region des Antikörpergens der aktivierten B-Zelle, binden sie die Antigene affiner als IgM. Für die plazentagängigen IgGs werden vier verschiedene Subklassen unterschieden (IgG1-4), welche nach ihrer abnehmenden Plasmakonzentration benannt sind. Von jenen können IgG1 und IgG3 am stärksten Komplement aktivieren sowie Fc γ -Rezeptoren binden und dienen durch Letzteres vordergründig der Antigenopsonisierung. Die dimere Form des IgA wird hauptsächlich im Respirations-, Gastrointestinaltrakt und innerhalb exokriner Drüsen (z.B. laktierender Brust) gebildet, passiert Epithelien und wirkt auf sich allein gestellt auf - Epitheloberflächen fehlen Komplement und Phagozyten - durch neutralisierende Antigenbindung. IgE Antikörper befinden sich zumeist Fc ϵ -rezeptorgebunden auf der Oberfläche von Mastzellen, aktivieren jene nach Vernetzung mehrerer durch Antigenkontakt und spielen so eine wichtige Rolle in der Parasitenabwehr, aber auch in der Pathophysiologie der Allergien.

Für die Diagnostik von Autoimmunkrankheiten haben Autoantikörper eine herausragende Bedeutung erlangt. Die Präsenz hochtitriger, spezifischer Serumautoantikörper wird als klinisch wegweisender Hinweis auf eine Autoimmunkrankheit gewertet. Häufig werden sie aber auch bei Patienten mit diffusen, schwer einzuordnenden Symptomen pro Forma mitbestimmt. Dabei ist ihre pathogenetische Bedeutung bisher nicht vollständig verstanden. Während beispielsweise die Pathogenität von Anti-BP180, Anti-Dsg1/3 oder Anti-Kollagen-VII Antikörpern für die Entwicklung bullöser Autoimmundermatosen experimentell belegt wurde [168], bleibt die Rolle der Anti-CCP-Antikörper für die Krankheitsentstehung der rheumatoiden Arthritis (RA) weiterhin teilweise unverstanden [146].

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Autoantikörper schon Jahre vor den ersten Symptomen und der Diagnose einer Autoimmunkrankheit wie bei Systemischem Lupus Erythematoses (SLE) oder RA im Serum der Patienten gefunden werden [1, 17, 61, 142]. So wiesen Arbuckle et al. retrospektiv bis zu zehn Jahre vor Krankheitsdiagnose im Serum an SLE erkrankter US-Soldaten SLE assoziierte Autoantikörper nach und beschrieben die progressive Akkumulation der spezifischen Autoantikörper vor Ausbruch der Krankheit [17].

Andererseits werden auch Patienten mit Autoimmunkrankheiten ohne Autoantikörpernachweis im Serum wie bei der seronegativen RA oder dem seronegativen SLE beobachtet [2]. Zudem treten Autoantikörper in vollkommen gesunden Menschen [148, 177] sowie in verschiedenen nicht autoimmunologisch bedingten Phänomenen, z.B. bei Infektionen [26, 60, 126, 130], onkologischen oder neurologischen Erkrankungen auf [128].

1.2 Autoimmunkrankheiten

1.2.1 Definition

Die Definition klinisch manifester Autoimmunität geht auf Mackay und Burnet zurück, welche 1962 mit ihrer Monographie „Autoimmune Diseases“ Autoimmunkrankheiten erstmals umfangreich beschrieben und damit die Basis für deren weitere Erforschung legten. Unter Autoimmunerkrankungen verstanden sie Krankheiten, bei denen durch immunkompetente körpereigene Zellen oder Antikörper, die sich gegen normale Körperbestandteile richten, strukturelle und funktionelle Schäden ausgelöst werden [144]. Schon damals erkannten sie, dass all jenen Krankheiten bestimmte klinische und pathologische Marker gemein waren: Präsenz von Autoantikörpern, Hypergammaglobulinämie, Ablagerung von Immunkomplexen und Akkumulation von Lymphozyten im betroffenen Gewebe, Prädominanz weiblicher Patienten sowie Besserung der Symptomatik unter Gabe von Kortikosteroiden. Selbst eine Überlappung verschiedener Autoimmunerkrankungen in Individuen stellten sie bereits dar [144].

Auch Witebsky beschrieb schon damals Kriterien, die die Autoimmunpathogenese von Krankheiten belegen sollten [200]. Nach Überarbeitung der Kriterien von Rose und Bona 1993 werden drei verschiedene Evidenzgrade unterschieden [147]:

1. Direkte Evidenz durch den Transfer von pathogenen Autoantikörpern oder autoreaktiven T-Zellen, welche beispielsweise in Versuchstiere injiziert (passive Immunisierung) zur typischen Krankheitsmanifestation führen. Dazu zählen beispielsweise auch die human-zu-humane diaplazentare Übertragung von maternalen Autoantikörpern gegen Acetylcholinrezeptoren mit Ausbildung neonataler Myasthenia gravis oder von Anti-SS-A-Antikörpern, die schwerwiegende fetale Herzrhythmusstörungen (AV-Block) verursachen können.
2. Indirekte Evidenz durch Reproduktion der Krankheit in Tiermodellen, welche nach aktiver Immunisierung mit dem Zielantigen eintritt.
3. Untergeordnete Evidenz aus dem Kontext klinischer Charakteristika wie Lymphozytenaggregation im betroffenen Organ, Prädisposition bestimmter MHC-Haplotypen, Ansprechen auf Immunsuppressiva oder Assoziation mit anderen Autoimmunkrankheiten im selben Individuum bzw. dessen Familie.

Heute werden mehr als 80 verschiedene Erkrankungen als spezifische Autoimmunkrankheiten unterschieden [90]. Ihre Gesamtprävalenz wird auf 3-10% geschätzt [47, 59, 90] und ist seit Jahrzehnten ansteigend [22].

1.2.2 Klassifikation

Um die Vielfältigkeit von Autoimmunerkrankungen zu klassifizieren, schlugen Mackay und Rose 1992 folgende Kategorisierung vor [116]:

1. Krankheiten wie Diabetes mellitus Typ I (T1DM) oder Autoimmunthyreoiditis, bei denen Organ-spezifische Antigene wie pankreatische Inselzellenzyme (z.B. Glutamat-Decarboxylase, Tyrosin-Phosphatase) oder schilddrüseneigene Proteine (z.B. Thyreoperoxidase, Thyreoglobulin) angegriffen werden.
2. Zelltyp-spezifische Erkrankungen, bei denen die pathologische autoimmunologische Reaktivität gegen im gesamten Körper verbreitete Antigene die klinische Symptomatik auslöst wie beispielsweise gegen das Antigen „Acetylcholinrezeptor“ bei Myasthenia gravis.
3. Paradox-Organ-spezifische Krankheiten, wohingegen Reaktivität gegen ebenso ubiquitär verbreitete Autoantigene aber nur in bestimmten Organen Schäden hervorruft und die Organ-typische klinische Symptomatik bedingt. Beispiele hierfür wären das mitochondriale Zielantigen AMA-2 bei Primär biliärer Zirrhose oder die cytoplasmatischen Transfer-RNA-Synthetasen (z.B. Jo-1, PL-7, PL-12 etc.) als Zielstrukturen bei Polymyositis.
4. Letztlich systemische Autoimmunerkrankungen wie SLE, bei denen eine pathologische Autoreaktivität gegen multiple ubiquitäre zelluläre Bestandteile Schäden in vielen verschiedenen Organen des Körpers verursacht.

1.2.3 Gemeinsames Auftreten verschiedener Autoimmunkrankheiten

Schon lange weiß man durch klinische Beobachtungen, dass Patienten unter mehr als einer Autoimmunkrankheit leiden können [147]. Dabei tritt dieses Phänomen überzufällig häufiger auf, als die gemeinsame Prävalenz der entsprechenden Krankheiten vermuten ließe [47]. Solche Überlappungen finden sich beispielsweise für Autoimmunthyreoiditis mit RA, T1DM und SLE [35, 172] oder auch für T1DM mit Anti-CCP positiver RA [108]. Die autoimmune Polyendokrinopathie findet sich in bis zu einem Drittel der Typ I Diabetiker, wobei diese dann zusätzlich unter Autoimmunthyreoditis (Anti-TPO, Anti-TSH), Perniziöser Anämie (Anti-PCA), Zöliakie (Anti-Gewebstransglutaminase) oder Morbus Addison (Anti-Steroid-21-Hydroxylase) mit charakteristischem Autoantikörpernachweis leiden [186]. Ferner neigen Patienten mit einer Autoimmunkrankheit dazu, ebenfalls Autoantikörper gegen andere spezifische Autoantigene ohne Krankheitswert zu bilden [74, 178, 194].

1.3 Bullöse Autoimmundermatosen

Bullöse Autoimmundermatosen (AIBD) sind organspezifische Autoimmunkrankheiten, bei denen Autoantikörper gegen Strukturproteine der Haut gebildet werden [168]. Physiologischerweise verhindert die große Anzahl der desmosomalen und hemidesmosomalen Verankerungsproteine, welche die Adhäsion der Epithelzellen untereinander sowie die Verankerung der Epidermis an der Dermis vermitteln, eine Schädigung der Haut durch starke mechanische Beanspruchung. Wird jedoch durch pathologische Autoantikörper die Funktion der Hautstrukturproteine beeinträchtigt, können bereits geringe mechanische Irritationen Blasen (sogenannte Nikolsky Phänomene I und II) und sekundär folgende Erosionen auslösen.

1.3.1 Epidemiologie

Bullöse Autoimmundermatosen sind insgesamt seltene Autoimmunkrankheiten. In Zentraleuropa und den USA weist das Bullöse Pemphigoid (BP) mit 6,1 bis 42,8 Neuerkrankungen/1 Mio. Einwohner/Jahr in verschiedenen epidemiologischen Studien mit Abstand die höchste Inzidenz auf [30, 31, 48, 50, 76, 92, 95, 106, 121, 209]. Interessanterweise beobachteten diese Studien eine Steigerung der Inzidenz um das Zwei- bis Fünffache innerhalb der letzten 10 Jahre. Als Gründe für diese Zunahme wird neben der Alterung der Gesellschaft auch die sensitivere bzw. spezifischere Diagnostik diskutiert, welche den signifikanten Anstieg aber wohl insgesamt nicht vollends erklären können. Die Inzidenzen weiterer subepidermaler bullöser Autoimmundermatosen liegen weit hinter der Häufigkeit des BP zurück [30, 31, 129].

Das Bullöse Pemphigoid betrifft vor allem alte Patienten mit einem durchschnittlichen Krankheitsbeginn in der siebten bis achten Lebensdekade [76, 95] und bürgt eine hohe Mortalität. So wiesen schweizer und französische Forscher in prospektiven Studien eine drei- bis sechsfach erhöhte Mortalität gegenüber der hinsichtlich Alters- und Geschlechtsverteilung bereinigten Vergleichspopulation nach, wobei die gemessenen 1-Jahres Überlebensraten nur bei 79% bzw. 62% lagen [48, 92]. Frauen sind insgesamt häufiger betroffen als Männer [92, 106].

Für alle Pemphiguserkrankungen zusammen liegt die beschriebene Inzidenz bei 0,6 bis 6,8 Neuerkrankungen/1 Mio. Einwohner/Jahr [24, 106, 121]. Während in Europa und Nordamerika Pemphigus vulgaris am häufigsten auftritt, wird in Nordafrika, Südamerika und der Türkei Pemphigus foliaceus am zahlreichsten beobachtet [123]. Das Erkrankungsalter liegt zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr [123]. Auch hier sind Frauen häufiger als Männer unter den Patienten vertreten [24, 106]. Neben sporadisch auftretenden werden auch endemisch gehäufte Pemphigus foliaceus Fälle (vor allem in ländlichen Gebieten Tunesiens und Südamerikas) unterschieden [24, 123].

1.3.2 Zielantigene

Autoantikörper gegen desmosomale Strukturproteine sind mit Pemphiguserkrankungen assoziiert; Antikörper gegen Hemidesmosomen finden sich bei subepidermal bullösen Autoimmundermatosen, zu denen das BP zählt (siehe Tabelle 1.1) [161, 168].

Hemidesmosomen sind Bestandteile des komplexen Proteinnetzwerks der dermo-epidermalen Junctionszone (DEJ) und dienen der Verankerung der basalen epidermalen Keratinozyten mit der darunter liegenden Basalmembran und Dermis. Dabei interagieren intrazelluläre Zytokeratinfilamente der basalen Keratinozyten über die hemidesmosomale Plaque, u.a. bestehend aus BP230 und Plektin, mit transmembranösen Proteinen wie BP180 und $\alpha_6\beta_4$ -Integrin [36]. Letztere stehen wiederum u.a. über Laminin-332 und Typ VII Kollagen mit dermalen Kollagenfasern in Verbindung (siehe Abbildung 1.1) [36]. Diese hemidesmosomalen Proteine sind Zielantigene der subepidermal blasenbildenden Autoimmundermatosen (siehe Tabelle 1.1).

Für das Bullöse Pemphigoid wurden BP180 und BP230 als Zielstrukturen beschrieben [56, 104, 175]. BP180, auch BPAG2 oder Typ XVII Kollagen genannt, ist ein 180 kDa großes transmembranöses Glykoprotein, welches ca. 1500 Aminosäuren umfassend bis in die Lamina densa reicht [206]. Während die meisten Patienten IgG Autoantikörper gegen viele verschiedene Epitope des Proteins bilden [55, 83, 135], ist der extrazelluläre Anteil der sechzehnten nicht-kollagenösen Domäne des Proteins (NC16A) als immundominante Region identifiziert wurden [72, 208]. Interessanterweise werden im Krankheitsverlauf unterschiedliche Epitope des BP180 angegriffen [54]. Autoantikörper gegen BP230, auch BPAG1, ein 230kDa schweres intrazelluläres Protein des hemidesmosomalen Plaques [36], richten sich vor allem gegen dessen C-terminale Domäne [55, 171].

Desmosomale Cadherine wie Desmoglein 1 (Dsg1), Desmoglein 3 (Dsg3), Desmocollin 1 (Dsc1) sorgen für die gegenseitige Adhäsion der epidermalen Keratinozyten (Zell-Zell-Adhäsion) (siehe Abbildung 1.1). Dabei interagieren die extrazellulären Bestandteile zweier gleicher Cadherine als Homodimere in trans-Stellung miteinander, während deren intrazellulären Domänen an desmosomale Plaqueproteine binden, welche wiederum Kontakt zu intrazellulären Intermediärfilamenten herstellen [194]. Bestandteil der intrazellulären desmosomalen Plaques sind auch Plakoglobin, Plakophilin, Desmoplakin sowie Envoplakin und Periplakin (nicht dargestellt) [194].

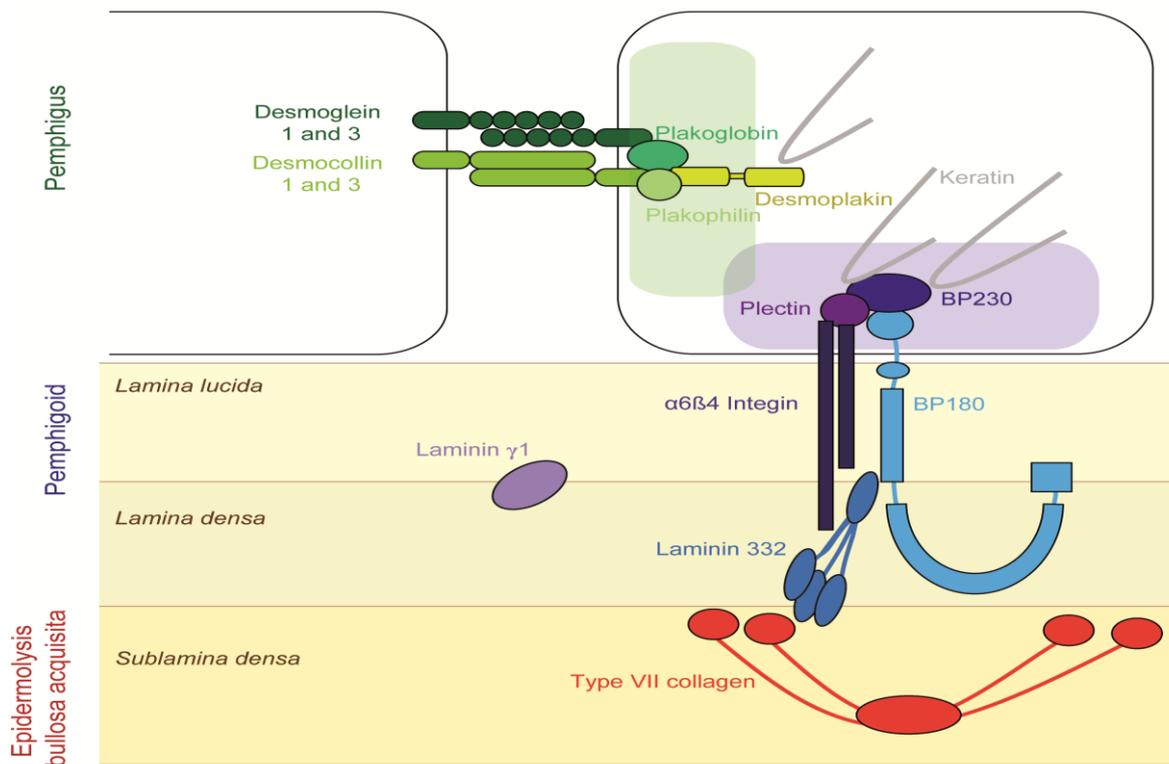


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der hemidesmosomalen und desmosomalen Strukturproteine der Haut.

Dargestellt sind lediglich Strukturproteine, gegen die im Rahmen von bullösen Autoimmundermatosen Autoantikörper gebildet werden. Die hemidesmosomalen Zielantigene der Pemphigoiderkrankungen sind hierbei in Blautönen dargestellt. Autoantikörper gegen Typ VII Kollagen sind mit Epidermolysis bullosa aquisita assoziiert (rot). Die desmosomale Verbindung zweier Keratinozyten ist Zielstruktur der Pemphiguserkrankungen und in Grüntönen abgebildet. Abbildung entnommen aus Bieber et al. 2010 [33].

Die Desmogleine werden in der Epidermis differenziell exprimiert: In verhornender Haut kommt Dsg3 nur in den unteren Schichten und Dsg1 prädominant in den oberen, schwächer auch den unteren Schichten vor; bei nicht-verhornender Haut findet sich Dsg3 in allen Schichten, während Dsg1 nur in den oberen Anteilen exprimiert wird [9, 119].

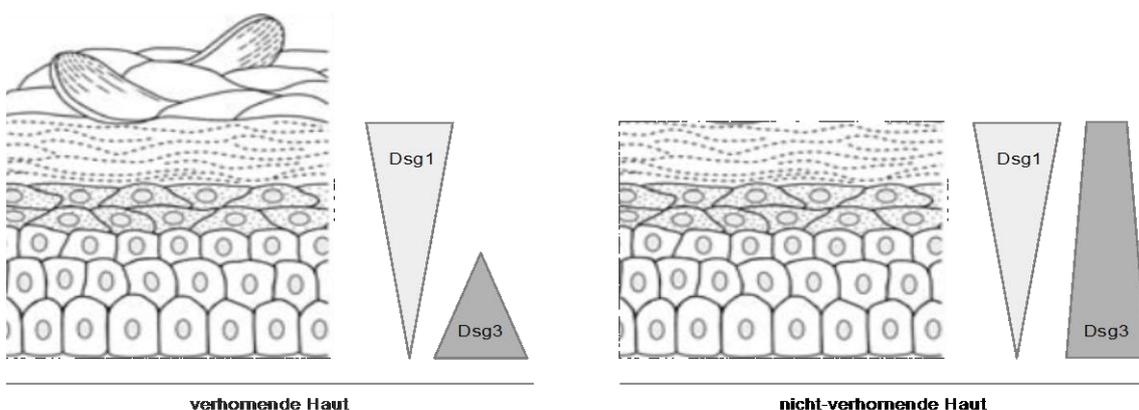


Abbildung 1.2: Differenzielle Desmoglein Expression in verhornender und nicht-verhornender Haut.

Abbildung erstellt nach Sitaru et al. 2004 [168] und Waschke 2008 [194].

Als Zielantigen des Pemphigus foliaceus wurde Dsg1 identifiziert [63, 79]. Bei Patienten mit Pemphigus vulgaris finden sich Anti-Dsg3- [8, 64, 79], bei Beteiligung der verhornenden Haut des Integuments auch Anti-Dsg1-Autoantikörper [12, 57]. Dsg1 (160kDa) und Dsg3 (130kDa) sind transmembranöse glykosylierte Oberflächenproteine der Keratinozyten, deren dreidimensionale Struktur Ca^{2+} -abhängig reguliert wird [63, 64]. Autoantikörper gegen Dsg1 und Dsg3 binden vor allem an Epitope des N-terminalen extrazellulären Anteils beider Antigene [43, 115, 164].

Daneben weisen Pemphiguspatienten auch Autoantikörper gegen mehr als 40 weitere desmosomale (z.B. Desmocolline, Dsg4, Plakine, E-Cadherin) und nicht-desmosomale Proteine (z.B. Acetylcholinrezeptoren, Annexine) auf [62, 74, 99, 131, 132].

In Abhängigkeit der Lokalisation der Blasenbildung und der Zielantigene werden verschiedene epidermale und subepidermale blasenbildende Autoimmundermatosen, welche in Tabelle 1.1 dargestellt sind, unterschieden [161, 162].

Tabelle 1.1: Zielantigene bullöser Autoimmundermatosen*

Spaltbildung	Erkrankung	Autoantigen(e)
Pemphigus-Erkrankungen		
epidermal, desmosomale Zielantigene	Pemphigus vulgaris	Dsg3, Dsg1
	Pemphigus foliaceus	Dsg1
	paraneoplastischer Pemphigus	Envoplakin, Periplakin, Desmoplakin I und II, α 2-Macroglobulin-like1, Plektin, Dsg1, Dsg3, BP230
	IgA-Pemphigus	Dsc1, Dsg3 (bei IgA Reaktivität)
Pemphigoid-Erkrankungen		
subepidermal, hemidesmosomale Zielantigene	Bullöses Pemphigoid	BP180 NC16A Domäne, BP230
	Pemphigoid gestationis	BP180 NC16A Domäne, BP230
	Schleimhautpemphigoid	BP180, Laminin 332 BP230, α 6 β 4 Integrin, Laminin 311, Typ VII Kollagen
	Lineare IgA-Dermatose	LAD-1 (lösliche Ektodomäne von BP180), BP230 (bei IgA Reaktivität)
	Anti-Laminin γ 1 / p200 Pemphigoid	Laminin γ1 (p200 Protein)
	Lichen planus pemphigoides	BP180 NC16A Domäne, BP230
subepidermal, hemidesmosomale Zielantigene	Epidermolysis bullosa aquisita	Typ VII Kollagen
	Dermatitis herpetiformis Duhring	Epidermale Transglutaminase

* Tabelle modifiziert nach Schmidt et al. 2011, Schmidt et al. 2013 und Sitaru et al. 2004 [161, 162, 168]. Fett hervorgehoben sind die hauptsächlich nachweisbaren Autoantigene.

1.3.3 Pathophysiologie

1.3.3.1 Bullöses Pemphigoid

Die pathogenetische Bedeutung der Anti-BP180 Autoantikörper für die Entstehung des BP ist experimentell belegt. Jordan et al. wiesen 1967 erstmals mittels indirekter Immunfluoreszenz Autoantikörper gegen die subbasale Zone der Epidermis im Serum von BP Patienten nach [93]. Entsprechend der Witebsky Kriterien (siehe Kapitel 1.2.1) gelang Jahre später der direkte Evidenzbeweis durch die Modellierung einer pemphigoidähnlichen Erkrankung im neonatalen Maussystem nach passivem Transfer von antimurinen-BP180-Antikörpern [113]. Mithilfe dieses Modells konnte im Verlauf auch die Bedeutung der Komplementaktivierung, von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen, verschiedener Proteasen und reaktiver Sauerstoffspezies für die Blasenentstehung dargelegt werden [33].

Die primäre Aktivierung des Komplementsystems und der Entzündungszellen scheint durch die Keratinozyten selbst ausgelöst zu werden. In vitro gebundene Anti-BP180-Autoantikörper stimulieren Fc-Rezeptor-unabhängig die Internalisierung des transmembranösen BP180 Glykoproteins, vermindern dessen Expression und führen zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-8 aus humanen Keratinozytenkulturen [88, 158]. Die Chemokine führen u.a. zur Aktivierung des Komplementsystems und Degranulation der Mastzellen mit konsekutiver Migration von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten in die Haut [33, 162]. Neben diesen beiden Interleukinen sind eine Vielzahl verschiedener pro- (u.a. IL-1 β , IL-4, IL-5, TNF α) und antiinflammatorischer Zytokine (u.a. IL-10) in der Blasenflüssigkeit von BP Patienten in erhöhter Konzentration vorhanden [13, 152, 153].

Hinzukommen Fc-Rezeptor-abhängige Effekte, welche in vitro in Kryoschnittmodellen [71, 169], aber auch in verschiedenen Mausmodellen [33] gezeigt wurden. Nach Inkubation von BP-Patienten-Serum auf Kryoschnitten humaner Haut zeigt sich subepidermal im Bereich der dermo-epidermalen Junctionszone eine Separation, nachdem isolierte Leukozyten gesunder Personen zugegeben wurden [71, 169]. Hierbei lösen Anti-BP180-NC16A-Autoantikörper, aber nicht Antikörper gegen andere Epitope des BP180 Glykoproteins oder gegen BP230 eine Spaltbildung aus [169], wodurch NC16A als pathogenetisch relevante Domäne identifiziert werden konnte.

Letztlich führt die zunehmende Entzündungsreaktion in der Haut zur Freisetzung von Proteasen und reaktiven Sauerstoffspezies aus den aktivierten Granulozyten. So spaltet die von Granulozyten sekretierte Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) den α 1-Proteinase Inhibitor, welcher nun nicht mehr die Neutrophilen Elastase (NE) hemmt [114]. Sowohl NE

als auch MMP-9 spalten Peptidbindungen von Proteinen der dermo-epidermalen Junctionszone und lösen so die Blasenbildung aus [110].

Aktive Mausmodelle mit transgenen Mäusen trugen zum Verständnis der Rolle der autoreaktiven CD4⁺-T-Zellen für die Autoantikörperproduktion bei. Zum einen konnte bei Wildtyp Mäusen durch wiederholte aktive Immunisierung mit murinem NC15A (äquivalent zu humanem NC16A) [82], zum anderen durch den Transfer von autoreaktiven Anti-BP180-NC16A-T-Lymphozyten [183] die Produktion von Anti-BP180 Antikörpern mit Blasenbildung in Mäusen ausgelöst werden. Letzteres Modell wurde mit immundefizienten Rag2^{-/-}/COL17 humanisierten Mäusen, welche Splenozyten von Wildtyp-Mäusen transferiert bekamen, die zuvor mit einem humanen-COL17 Hauttransplantat immunisiert wurden, durchgeführt [183]. Dabei zeigte sich, dass die Depletion der CD4⁺-T-Zellen vor Transfer in die immundefizienten Rag2^{-/-}/COL17 humanisierten Mäusen die Anti-BP180 Autoantikörperproduktion inhibiert [183], da diese autoreaktiven Anti-BP180-NC16A CD4⁺-T-Lymphozyten über CD40-CD40L Interaktion naive B-Zellen zur Anti-BP180-NC16A IgG Produktion in vivo anregen [184]. Anti-BP180-NC16A IgE Autoantikörper sind ebenso pathogenetisch bedeutsam und unterstreichen die Bedeutung der Mastzellen und Eosinophilen in der Pathophysiologie der Blasenentstehung [66, 210]. Patienten mit Anti-BP180-NC16A IgE Antikörpern leiden unter schweren klinischen Verläufen [58, 89], die in Fallstudien gut auf die Therapie mit Omalizumab, einem monoklonalen IgE Inhibitor, ansprechen [65].

Schlussendlich liefert auch die nachweisbare Korrelation von Antikörperspiegel und Krankheitsaktivität klinische Evidenz für die Schlüsselrolle der Anti-BP180-Autoantikörper in der Pathogenese des BP [58, 157].

Im Gegensatz zu BP180 ist die pathogenetische Bedeutung von Autoantikörpern gegen BP230 trotz vielfältiger experimenteller und klinischer Studien weiter unklar [162].

1.3.3.2 Pemphigus

Auch für Anti-Dsg1- und Anti-Dsg3-Autoantikörper ist die pathogenetische Bedeutung in vitro und in vivo dargelegt wurden, wenngleich ihre Rolle in der Immunpathogenese des Pemphigus bis heute auch umstritten ist [4]. Bereits in den 70er Jahren gelang es Schiltz et al. in vitro mit IgG von Pemphigus-Patienten den Verlust der Zell-Zell-Adhäsion der epidermalen Keratinozyten, Akantholyse genannt, in kultivierter humaner Haut auszulösen [150] und nach Bindung der Autoantikörper an kultivierte Keratinozyten, deren Zelluntergang zu induzieren [151]. Im ersten passiven Mausmodell banden nach Injektion von IgG von Pemphigus vulgaris-Patienten in neonatale BALB/c Mäuse die Antikörper an interzelluläre epidermale Kontaktproteine und induzierten ebenso Akantholyse [14, 176].

Später gelang es durch Affinitätsaufreinigung gegenüber chimären Proteinen, bestehend aus den extrazellulären Domänen von Dsg1 oder Dsg3 zusammen mit der konstanten Region (Fc) von IgG1, spezifische Anti-Dsg1- bzw. Anti-Dsg3-Autoantikörper aus dem Serum der Patienten zu entfernen [5, 6]. Danach konnte mit diesem Serum im passiven Mausmodell jeweils keine intraepidermalen Blasenbildung ausgelöst werden [5, 6]. Dabei erwiesen sich sowohl in vivo [7] als auch in vitro [32] die Autoantikörper gegen die N-terminale Domäne des Dsg3 als pathogenetisch relevant. Auch der diaplazentare passive Transfer von maternalen Anti-Dsg1- und/oder Anti-Dsg3-Autoantikörpern während der Schwangerschaft, welcher beim Neugeborenen zum neonatalen Pemphigus foliaceus oder vulgaris führt, liefert direkte Evidenz für die pathogenetische Bedeutung dieser Autoantikörper [19, 77, 190].

Zum Studium der Rolle der T- und B-Zellen in der Effektorphase der Krankheitsentstehung steht ein aktives Mausmodell von Amagai und Kollegen zur Verfügung. Dabei immunisierten sie Dsg3-defiziente Mäuse mit Dsg3, sodass sich autoreaktiven Immunzellen bilden konnten und transferierten anschließend die Splenozyten dieser Mäuse in immuninkompetente Rag2^{-/-} Mäuse, welche Dsg3 exprimierten [11]. Der anhaltende Toleranzverlust der T- und B-Zellen führte zur kontinuierlichen Produktion von Anti-Dsg3-Antikörper, woraufhin sich instabile Blasen und Erosionen in den Schleimhäuten der Rag2^{-/-} Mäuse ausbildeten [182].

Klinische Evidenz für die pathogenetische Schlüsselrolle findet sich durch Korrelation der Anti-Dsg1 bzw. Anti-Dsg3-Antikörper mit der Krankheitsaktivität im Individuum [78, 87, 154].

Die Bedeutung aller weiteren gefundenen Autoantikörper (z.B. gegen Dsg4, Desmocolline, E-Cadherin, Acetylcholinrezeptoren etc.) für die Pathophysiologie ist noch weitgehend unklar: So konnte eine alleinige Pathogenität der mit Dsg1 kreuzreagierenden Autoantikörper gegen Dsg4 und E-Cadherin nicht belegt werden [62, 127]. Andererseits führte IgG von Patienten, welches von Anti-Dsg1-Antikörpern befreit wurde, nach passiver Immunisierung in Dsg3-defizienten Mäusen dennoch zur Blasenentstehung [133]. Für diesen Effekt werden unter anderem die Autoantikörper gegen Acetylcholinrezeptoren der Keratinozyten verantwortlich gemacht [74]. So lösen Anti- α 9-Acetylcholinrezeptor Antikörper in vitro Pemphigus-ähnliche Akantholyse aus, welche durch die Gabe von Carbachol, einem Cholinagonist, rückgängig gemacht werden kann [131]. Andererseits erzeugen isolierte Antikörper gegen Pemphaxin, ebenso ein Acetylcholinrezeptor, alleine keine Blasenbildung in vivo [132].

Im Vordergrund der Blasenentstehung stehen Akantholyse und Apoptose der Keratinozyten. Im Gegensatz zum BP laufen diese Prozesse ohne begleitende Entzündungsreaktion ab. Obwohl C3 Ablagerungen in der Haut der Patienten gefunden werden [94], ist keine Komplementaktivierung oder Leukozyteninfiltration zur Spaltbildung in vivo notwendig [15, 170]. Generell werden zwei verschiedene Mechanismen der Störung der desmosomalen Adhäsion nach Bindung der Anti-Dsg1- bzw. Anti-Dsg3-Antikörper beschrieben [194]: Zum einen direkte Effekte durch Blockierung der adhäsiven N-terminalen Domäne der Desmogleine mit sterischer Behinderung der trans-Interaktion der Homodimere, welche bisher nur für Dsg3 nachgewiesen wurden [81, 181, 195]. Zum anderen indirekte Einflüsse auf vielfältige intrazelluläre Signalwege, welche die Zell-Zell-Adhäsion herunter regulieren und Apoptose induzieren können. Zu diesen verschiedenen Signaltransduktionswegen zählen u.a. Aktivierung von Phospholipase C mit konsekutivem intrazellulärem Ca^{2+} Anstieg [119, 120], Phosphorylierung von p38-mitogenaktivierter Proteinkinase (p38MAPK) und Hitzeschockprotein HSP27 [28, 29, 27, 107], p38-MAPK abhängige Inaktivierung von Rho A GTPase [174, 196] sowie Aktivierung von Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und c-Src-Tyrosinkinase [45].

Es resultieren Effekte auf die Desmosomen selbst wie z.B. Depletion desmosomaler Komponenten von der Zelloberfläche, Internalisierung und lysosomale Zersetzung von Dsg3 oder Relokalisierung von Plakoglobin und Desmoplakin [16, 42, 149, 196, 199, 201]. Parallel dazu wird die Dysorganisation des intrazellulären Zytoskeletts, auch Zytokeratinretraktion genannt, beobachtet, wobei sich Aktine, Keratine wie auch Mikrotubuli von den interzellulären Zell-Zell-Verbindungen lösen und perinukleär ansammeln [28, 41, 42, 45, 196, 198, 199]. All diese Veränderungen führen zur Schrumpfung der Keratinozyten mit Verlust der Zell-Zell-Kontakte (Akantholyse). Es war umstritten, ob die Autoantikörper selbst über Signaltransduktion oder erst die akantholytischen Zellschäden den programmierten Zelltod, die Apoptose, auslösen [194]. In vitro Modellen konnten neben Kernfragmentierung, die Expression zahlreicher proapoptotischer Moleküle wie Fas, FasL, p53, Caspase 3 und Suppression Antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 oder FLIP_L nachgewiesen werden [23, 45, 69, 134, 139, 192]. Dabei scheint die Apoptose der Keratinozyten sekundär zur Akantholyse aufzutreten [25, 107, 156, 159]. So führte die Inkubation mit IgG von Pemphigus vulgaris Patienten in kultivierten Keratinozyten zum Verlust der Zell-Zell-Adhäsion mit Retraktion der Zytokeratine ohne Hinweis auf apoptotische Vorgänge wie Spaltung des proapoptotischen Enzyms Caspase-3 oder Fragmentierung des Zellkerns [156].

1.3.4 Klinik

Im Folgenden werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die klinischen Symptome des Bullösen Pemphigoids und des Pemphigus vulgaris bzw. foliaceus umrissen:

1.3.4.1 Bullöses Pemphigoid

Die Lokalisation der Spaltbildung erklärt die klinische Präsentation der blasenbildenden Autoimmundermatosen. Bei den subepidermal bullösen Autoimmundermatosen, bei denen die Spaltbildung zwischen Epidermis und Dermis verläuft, entstehen pralle Blasen, da das Blasendach alle Epidermisschichten umfasst und somit recht dick ist [162]. Die Blasen sind mit seröser Flüssigkeit gefüllt, können mehrere Tage persistieren und verursachen sekundär Erosionen, Krusten und Narben. Sie sind vorwiegend an den Beugeseiten der Extremitäten sowie über dem Abdomen lokalisiert und werden häufig von einem Erythem begleitet (siehe Abbildung 1.3) [162]. In 10 bis 20% der Fälle können auch orale Schleimhautläsionen beobachtet werden [155]. Fast alle Patienten mit BP leiden bereits Wochen bis Monate vor Blasenentstehung unter starkem Juckreiz, in einigen Fällen prodromal begleitet durch ekzematöse, papulöse oder urtikarielle Plaques [162]. In manchen Patienten bleiben diese nicht-bullösen Varianten auch dauerhaft erhalten [155].



Abbildung 1.3: Klinische Präsentation des Bullösen Pemphigoids.

(A) Pralle, mit seröser Flüssigkeit gefüllte Blasen auf erythematösem Grund am Arm einer Patientin. (B,C) Es zeigen sich nebeneinander Erythem und pralle Bullae (Primäreffloreszenzen) sowie Erosionen und Krusten (Sekundäreffloreszenzen). (A-C) Bilder zur Verfügung gestellt von PD Dr. med. Kirsten Jung.

1.3.4.2 Pemphigus

Bei den Pemphiguserkrankungen verläuft die Spaltbildung innerhalb der Epidermis, woraus ein dünnes, instabiles Blasendach resultiert. Es entstehen schlaflige Blasen, die leicht zerreißen und Erosionen hinterlassen (siehe Abbildung 1.4). So imponieren beim Pemphigus vulgaris klinisch häufig nur Erosionen und selten schlaflige Blasen. Da das Zielantigen des Pemphigus vulgaris Dsg3 in Schleimhäuten im Vergleich zur verhornten Haut in allen Epidermisschichten exprimiert wird [119], sind vordergründig die Schleimhäute betroffen (Mukosa-dominante Form); nur bei gleichzeitigen Vorliegen von Anti-Dsg1 Autoantikörpern kommt es auch zur Beteiligung der Haut des Integuments (Mukokutane Form) [12]. Beim Pemphigus foliaceus (Dsg1 als Zielantigen) finden sich fast ausschließlich nur noch Erosionen ohne Blasen, die Schleimhäute sind immer frei [12, 161].

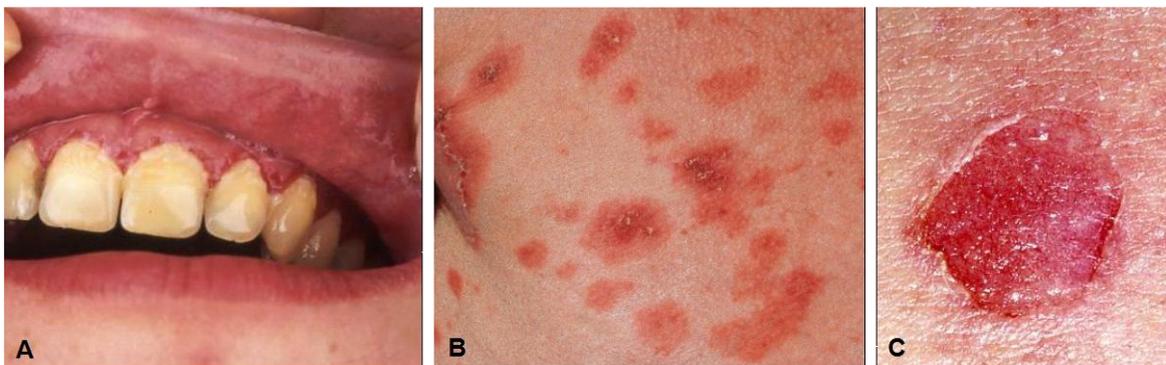


Abbildung 1.4: Klinische Präsentation der Pemphiguserkrankungen.

(A) Multiple Erosionen der oralen Schleimhaut als typische Manifestation des Pemphigus vulgaris; die Autoantikörper sind gegen Dsg 3 gerichtet. (B) Scharf begrenzte erythematöse Plaques mit Schuppenbildung ohne erkennbare Blasenbildung als Manifestation des Pemphigus foliaceus am Oberkörper eines Mannes; die Autoantikörper sind gegen Dsg 1 gerichtet. (C) Detailaufnahme einer scharf begrenzten Erosion nach schneller Ruptur der schlafligen Blasen des Pemphigus foliaceus. (A, C) Bilder zur Verfügung gestellt von PD Dr. med. Kirsten Jung; (B) entnommen von Altmeyer, Enzyklopädie der Dermatologie, 2011 [3].

1.3.5 Diagnostik

1.3.5.1 Histopathologie

Die histopathologische Untersuchung zeigt die bullöse Dermatose mit Höhe der Spaltbildung (intra- versus subepidermal) und das Ausmaß der Infiltration mit Entzündungszellen im Gewebe (siehe Abbildung 1.5). So ist beispielsweise beim BP die subepidermale Spaltbildung mit einer reichen Infiltration eosinophiler Granulozyten in Dermis und Blasenlumen assoziiert [168]. Beim Pemphigus vulgaris findet sich die intraepidermale Spaltbildung unmittelbar suprabasal, beim Pemphigus foliaceus innerhalb des Stratum granulare [194]. Für die Histopathologie muss eine möglichst frische Blase (vollständig oder partiell) mit Übergang in die gesunde Haut biopsiert, in Formalin fixiert und beispielsweise mit Hämatoxilin/Eosin angefärbt werden.

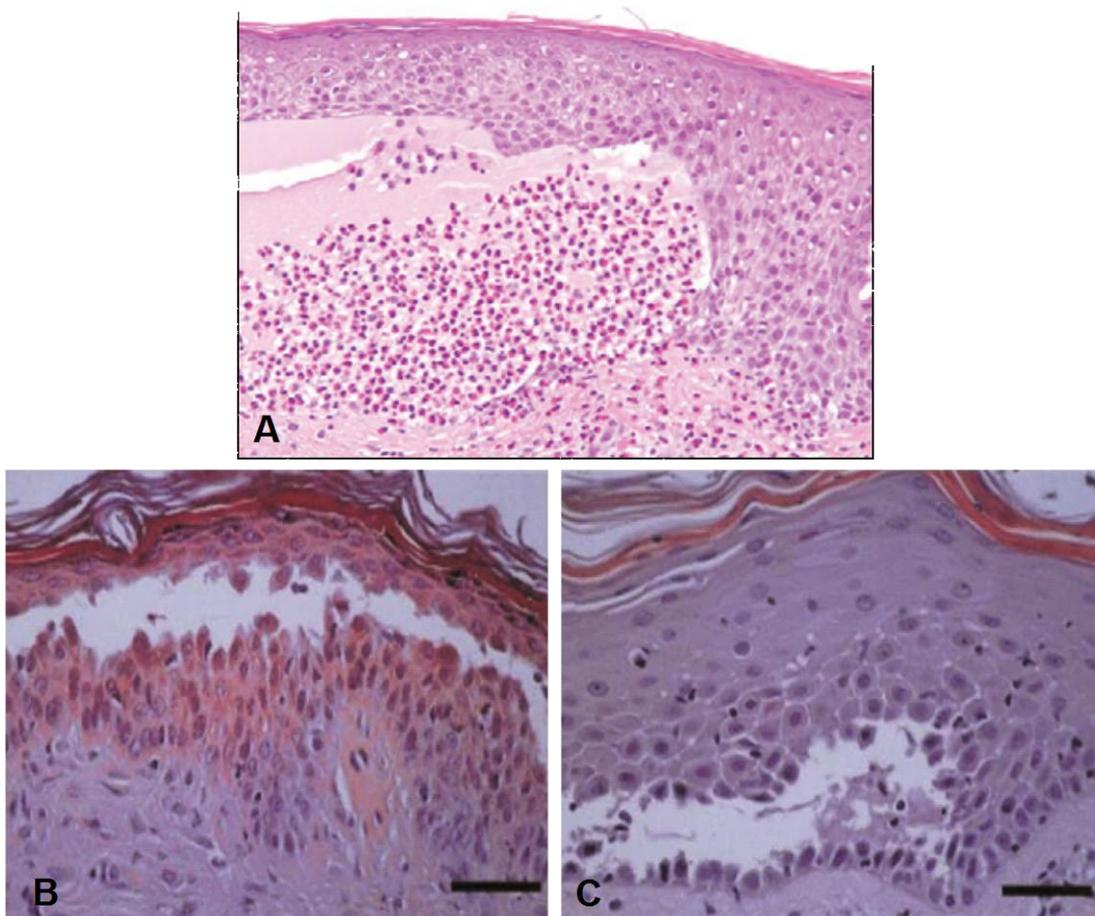


Abbildung 1.5: Histopathologie von blasenbildenden Autoimmundermatosen

(A) zeigt eine läSIONALE Hautbiopsie mit subepidermaler Blasenbildung entlang der dermo-epidermalen Junctionszone und dichtem Infiltrat eosinophiler Granulozyten als typische histopathologische Befunde beim BP; H&E, x40. (B) und (C) stellen die intraepidermalen Spaltbildungen der Pemphiguserkrankungen dar. Aufgrund der unterschiedlichen Expression von Dsg 1 und Dsg 3 in verhornter Epidermis kommt es beim Pemphigus foliaceus (B) zur subkornealen Spaltbildung (Zielantigen Dsg1), während beim Pemphigus vulgaris (C) die Trennung suprabasal verläuft (Zielantigen Dsg3). (A) entnommen von Schmidt et Zillikens, 2013 [162]; (B, C) entnommen von Bieber et al. 2010 [33].

1.3.5.2 Direkte Immunfloreszenz

Der Goldstandard zur Diagnostik von AIBD (versus anderer bullöser Dermatosen) ist die direkte Immunfluoreszenz, mit der gewebgebundene Autoantikörper und Komplementfaktoren wie C3 in der Haut/Schleimhaut der Patienten nachgewiesen werden können [161]. Dazu wird gesund erscheinende Haut in der Umgebung von Blasen (periläsional) biopsiert und nativ mit flüssigem Stickstoff fixiert. Im Bereich der Blase selbst sind die Autoantikörper bzw. Komplementfaktoren meist durch die Entzündungsreaktion zerstört und nicht mehr nachweisbar [168]. Zur Darstellung werden fluoreszenzmarkierte Anti-Human-IgG/IgA bzw. Anti-C3 Sekundärantikörper verwendet. Das Fluoreszenzmuster erlaubt dann die Unterscheidung von subepidermalen blasenbildenden Autoimmundermatosen und Pemphiguserkrankungen [161]. Während bei den subepidermalen blasenbildenden Autoimmundermatosen lineare Ablagerungen entlang der dermo-epidermalen Junktionszone zu finden sind, entstehen beim Pemphigus interzelluläre (netzförmige) epidermale Ablagerungen (siehe Abbildung 1.6) [168]. Bei der Dermatitis herpetiformis Duhring visualisieren sich granuläre IgA-Ablagerungen in den Papillenspitzen der Dermis [168].

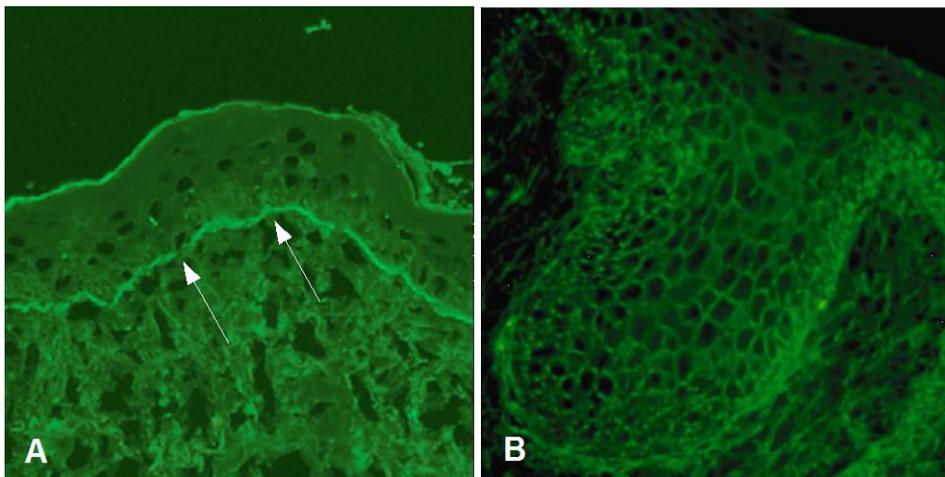


Abbildung 1.6: Direkte Immunfluoreszenz.

Durch fluoreszenzmarkierte Anti-human-IgG Antikörper kann die Ablagerung von IgG in der Haut dargestellt werden. (A) Bullöses Pemphigoid mit linearer IgG Ablagerung entlang der dermo-epidermalen Junktionszone (Pfeile); entnommen von Schmidt et Zillikens, 2013 [162]. (B) Pemphigus foliaceus mit interzellulärer (netzförmiger) Ablagerung zwischen den epidermalen Keratinozyten; entnommen von Yuen et Yau, 2012 [203].

1.3.5.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Für den Nachweis von Autoantikörpern im Serum der Patienten wird die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) eingesetzt. Die Inkubation der Serum- oder Plasmaproben auf Zielgeweben ermöglicht die Bindung spezifischer Autoantikörper, welche durch fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden. Für die subepidermal blasenbildenden Autoimmundermatosen wird dafür mit 1M NaCl-Lösung gespaltene humane Haut verwendet [97]. In Abhängigkeit des Zielantigens kann hierdurch eine Bindung der Autoantikörper an Blasendach (BP180, BP230) und Blasenboden (Laminin γ 1/p200, Laminin 332, Typ VII Kollagen) unterschieden werden und hinweisend auf die korrespondierende Erkrankung sein (siehe Abbildung 1.7) [161, 162]. Für das Screening auf Pemphigus oder Dermatitis herpetiformis Duhring assoziierte Autoantikörper wird als sensitivstes Substrat Affenösophagus verwendet [161]. Dabei binden Anti-Dsg3 bzw. Anti-Dsg1-Antikörper mit einem interzellulären Muster an der Epidermis [168] (siehe vergleichbare direkte Immunfluoreszenz Abbildung 1.6 B). In der IIF von Dermatitis herpetiformis Duhring Patienten finden sich keine epidermalen oder dermalen Autoantikörperablagerungen, sondern IgA-Antikörper gegen Endomysium in der Tunica muscularis des Affenösophagus [168].

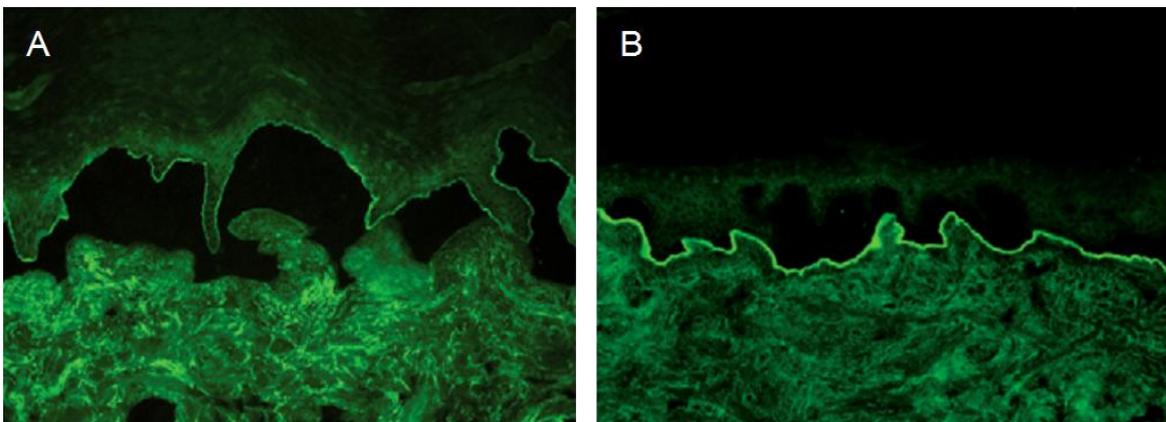


Abbildung 1.7: Indirekte Immunfluoreszenz der subepidermal blasenbildenden Autoimmundermatosen mittels humaner Spalthaut.

Durch Nutzung von mit 1 M NaCl Lösung gespaltener humaner Haut können die subepidermal blasenbildenden Autoimmundermatosen weiter differenziert werden. (A) Autoantikörper gegen BP180, BP230 und α 6 β 4-Integrin binden am Blasendach. (B) Autoantikörper gegen Laminin γ 1/p200, Laminin 332 und Typ VII Kollagen binden am Blasenboden. (A, B) entnommen von Schmidt et Zillikens, 2013 [162].

1.3.5.4 Bestimmung der Zielantigene

Die exakte Bestimmung des Zielantigens kann mittels ELISA oder Immunoblot erfolgen. Fast alle Patienten können heute serologisch diagnostiziert werden (siehe Vielfalt der beschriebenen relevanten Zielantigene in Tabelle 1.1) [161].

In Kürze: Zur Diagnostik des BP können zirkulierende IgG-Autoantikörper gegen BP180-NC16A und BP230 mit kommerziell erwerblichen ELISA Systemen in 80-90% bzw. 60-70% der Patienten nachgewiesen werden [101, 167, 202, 207]. Die IgG-Antikörper gegen BP180-NC16A zeigen eine Prädominanz der IgG4-Subklasse [58]. Weiterhin finden sich mehrzählig bei BP Patienten auch IgA- und IgE-Autoantikörper [58, 89, 100].

Für den Nachweis von Anti-Dsg1-, Anti-Dsg3- und Anti-Envoplakin-Antikörpern existieren ebenso sensitive und spezifische kommerzielle ELISA Testsysteme [10, 136, 154]. Ebenso wie beim BP finden sich auch bei Pemphigus foliaceus und vulgaris neben IgA-, IgE- mehrheitlich spezifische IgG4-Autoantikörper, die mutmaßlich für den Anstieg des IgG4-Gesamtspiegels im Serum der Patienten verantwortlich sind [32, 70, 173]. Seltener Autoantikörper (z.B. gegen Periplakin für paraneoplastischen Pemphigus, Laminin 332 für Schleimhautpemphigoid oder Typ VII Kollagen für EBA) werden durch nicht kommerzielle ELISAs oder Immunoblots mit Antigenextrakten kultivierter humaner Keratinozyten nachgewiesen [161]. Bei Dermatitis herpetiformis Duhring lassen sich die IgA-Autoantikörper gegen epidermale und gewebständige Transglutaminase mittels ELISA bestimmen [161].

Wie oben erwähnt korreliert die Höhe der Autoantikörperspiegel im Falle von BP180 (beim Bullösen Pemphigoid), Dsg3 (beim Pemphigus vulgaris) und Dsg1 (beim Pemphigus foliaceus) mit der Krankheitsaktivität [58, 78, 87, 157, 154] und kann deswegen zum Monitoring des Krankheitsverlaufes genutzt werden [161].

Die Prävalenz der Pemphigus- und Pemphigoid assoziierten Autoantikörper in Gesunden ist bislang anhand kleiner mitgeführter Kontrollgruppen zumeist bei der Neuentwicklung der ELISA oder Immunoblot Testverfahren dargestellt wurden. Dabei variiert die publizierte Prävalenz von Antikörpern gegen Dsg1 zwischen 0 und 0,7%, Dsg3 zwischen 0 bis 0,2%, BP180 zwischen 0 bis 57 % und BP230 zwischen 0 bis 9% [34, 53, 87, 98, 101, 154, 167, 202, 207].

1.4 Entwicklung der Zielstellungen

Für verschiedene Autoimmunkrankheiten (z.B. SLE, RA) ist bekannt, dass pathogen relevante Autoantikörper schon Jahre vor den ersten Symptomen und der Diagnosestellung im Serum der Patienten gefunden werden [1, 17, 61, 142]. Folglich ist anzunehmen, dass auch Autoantikörper der blasenbildenden Autoimmundermatosen der entsprechenden Krankheit vorrausgehen und in Gesunden nachweisbar sind. Die Prävalenz der Pemphigoid- und Pemphigus-assoziierten Autoantikörper in Gesunden ist bislang nicht systematisch untersucht worden. Publierte Häufigkeiten wurden nur in kleinen mitgeführter Kontrollgruppen zumeist bei der Neuentwicklung von ELISA Testverfahren ermittelt. Dadurch sind die angegebenen Frequenzen teils widersprüchlich, eine valide Basis zur Interpretation positiver Antikörpertests in der klinischen Praxis fehlt.

Vielfältige klinische Studien haben das überzufällig häufige gleichzeitige Auftreten verschiedener Autoimmunkrankheiten innerhalb eines Patienten belegt [35, 47, 108, 147, 172, 186]. Zusätzlich ist auch die Antikörperbildung gegen andere spezifische Autoantigene in bereits erkrankten Autoimmunpatienten beobachtet worden [74, 178, 194]. Noch unklar ist jedoch, ob auch klinisch Gesunde dazu neigen, verschiedene krankheitsspezifische Autoantikörper wie z.B. Antinukleäre Antikörper (ANA), Anti-CCP, Anti-TPO oder Anti-PCA, gleichzeitig (kookkurrent) zu bilden. Falls auch in Gesunden spezifische Autoantikörper überzufällig häufig überlappend zu finden sind, wäre dies hinweisend auf eine übergeordnete Kontrolle des Toleranzverlustes. Da ANA zu den am häufigsten in Gesunden nachgewiesenen Autoantikörpern [112, 148, 177] zählen, könnten Überlappungsanalysen zwischen ANA und selteneren Autoantikörpern durchgeführt werden.

1.4.1 Ziele der Arbeit

Aus den zuvor geschilderten bisher unbeantworteten Aspekten ergeben sich folgende Zielstellungen für diese Arbeit:

1. Die Bestimmung von Pemphigoid- und Pemphigus-assoziierten Autoantikörpern in einer großen Kohorte gesunder Blutspender, um eine systematische Untersuchung zu ermöglichen.
2. Die Bestimmung weiterer krankheitsspezifischer Autoantikörper (Anti-CCP, AAK gegen endokrine Organe, ANCA) in Gesunden, als Grundlage für die Überlappungsanalyse.
3. Die Untersuchung der Kookkurrenz verschiedener Autoantikörper in Gesunden, um Hinweise auf eine gemeinsame Kontrolle des Toleranzverlustes zu gewinnen. Dazu sollen die Frequenzen der Autoantikörper gegen BP180/230, Dsg1/3, CCP, TPO, PCA und ANCA in ANA Positiven und ANA Negativen verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Ethik

Diese Studie wurde durch die lokale Ethikkommission genehmigt und entsprechend der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Blutspender wurden über die Verwendung der Blutproben für diese Studie vor Blutentnahme mündlich und schriftlich aufgeklärt und unterschrieben eine Einverständniserklärung. Aufgrund der Einschränkung des Ethikvotums wurden alle Proben sofort nach Entnahme anonymisiert und eindeutige Identifikationsnummern vergeben.

2.2 Blutproben

Für diese Arbeit wurden im Zeitraum August 2010 bis März 2011 insgesamt 10.155 Blutproben gesunder Blutspender in Zusammenarbeit mit Jasper Prüßmann gesammelt. Prof. Siegfried Görg und Dr. David Juhl ermöglichten die Sammlung der Vollblutproben regulärer Blutspender des Instituts für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in Lübeck und Kiel; ebenso Prof. Reinhard Henschler für das Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Deutsches Rotes Kreuz Blutspenderservice Baden-Württemberg - Hessen, Goethe-Universität in Frankfurt/Main.

Zur Vermeidung doppelter Testungen aufgrund der Anonymisierung wurden Blutproben regelmäßiger Spender innerhalb von acht Wochen, dem kürzesten Blutspendeintervall für Männer, gesammelt. Alle weiteren Proben stammten von Neuspendedern, somit Personen, die zum ersten Mal in dem entsprechenden Institut Blut spendeten. Das Alter aller Blutspender lag zwischen 18 und 68 Jahren ($39,9 \pm 14,3$ Jahre) und bezogen auf Neuspender zwischen 18 und 60 Jahren ($27,4 \pm 10,6$ Jahre).

Vor jeder Blutentnahme wurde unter ärztlicher Kontrolle die Spendetauglichkeit mittels Anamnese, orientierender körperlicher Untersuchung und Laboratoriumsdiagnostik unter Beachtung der Einschluss-, sowie dauerhaften und zeitlich begrenzten Ausschlusskriterien festgestellt (siehe Anhang Abschnitt 7.3) [38]. In Deutschland sind nur gesunde Personen im Alter von 18 - 68 Jahren berechtigt, Blut zu spenden [38].

Bis zur Aufbereitung wurden die Proben in EDTA-Monovetten (*Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland*) bei 4°C gelagert und transportiert. Zur Gewinnung von Blutplasma wurde das Vollblut 7min bei Raumtemperatur und 2500xg (*Heraeus Sepatech Megafuge 1.0 R*) zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und aliquotiert. Jedes Aliquot wurde mit der Identifikationsnummer des Spenders versehen. Alle Plasmaproben wurden bei -20°C gelagert.

2.3 Prinzip der Indirekten Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) gilt als Standardtechnik für den in vitro Nachweis von Autoantikörpern im humanen Plasma oder Serum. In einem ersten Schritt wurden die Patientenproben mit dem Substrat inkubiert, sodass spezifische Antikörper der Klasse IgG, IgA und IgM an die dargebotenen Antigene binden konnten. Gefrierschnitte von Zielgeweben präsentierten eine Vielzahl von Antigenen. Monospezifische Substrate wie Antigen-Dots bzw. Antigen-exprimierende Zellen ermöglichten eine Differenzierung der Zielantigene. Zur Detektion gebundener Antikörper wurden Fluorescein-markierte Sekundärantikörper (Anti-Human-IgG oder Anti-Human-IgAGM) eingesetzt. Die Antikörper waren morphologisch punktgenau wie das korrespondierende Antigen lokalisiert; für jeden Antikörper ergab sich folglich ein charakteristisches Fluoreszenzmuster [211]. Diese Muster erlaubten eine visuelle Diskriminierung verschiedener Antikörper. Durch die Kombination verschiedener Substrate auf einem Testfeld (Biochip-Mosaik) konnten unterschiedliche Antikörper gleichzeitig untersucht werden. Bei negativem Befund ließ sich die Präsenz einer Vielzahl von Antikörpern ausschließen. Somit war die IIF Testung auch als Screeninguntersuchung für Antikörper gegen Hautstrukturproteine geeignet.

2.4 Autoantikörper gegen Hautstrukturproteine

2.4.1 Screening mittels Indirektem Immunfluoreszenz Assay

Insgesamt wurden 7.063 Blutspender auf die Präsenz von Antikörpern gegen Hautstrukturproteine durch die Doktorandin persönlich untersucht. Für die qualitative in vitro Bestimmung von Pemphigus- (Dsg1, Dsg3) und Pemphigoid-assoziierten (BP180, BP230) Autoantikörpern konnte durch Unterstützung von Prof. Winfried Stöcker das kommerziell erwerbliche indirekte Immunfluoreszenz Testsystem Dermatologie-Mosaik 7 (*Euroimmun AG, Lübeck*) verwendet werden. Das Biochip-basierte Verfahren enthielt pro Objektträger zehn Reaktionsfelder mit sechs verschiedenen Substraten: Ösophagus (Affe), Spalthaut (Affe), flächig aufgetragenes rekombinantes tetrameres BP180-NC16A sowie transfizierte HEK293 Zellen, welche rekombinantes BP230gC, Dsg1 oder Dsg3 exprimierten [52].

Der Assay wurde nach Standardprotokoll des Herstellers durchgeführt; fast alle benötigten Verbrauchsmaterialien befanden sich in der Testpackung. Folgende Materialien waren nicht enthalten: Ampuwa Spüllösung (*Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg*), Reagenzträger Titerplane (*Euroimmun AG, Lübeck*). Zunächst wurden die Plasmaproben im Verhältnis 1:10 mit PBS-Tween verdünnt. Die Herstellung von PBS-Tween erfolgte mit 1l Ampuwa Spüllösung, 1 Packung „Salz für PBS pH 7,2“ und 2ml Tween 20 unter 20min rühren bis der Puffer schlierenfrei war. Je 30µl der

verdünnten Proben wurden bei Raumtemperatur für 30min auf den Objektträgern mit den Substraten inkubiert (siehe Abbildung 7.1 im Anhang). Die Verwendung des Reagenzträgers Titerplane, welcher die Objektträger komplementär verschließt, ermöglichte den gleichzeitigen Inkubationsstart aller Proben und verhinderte die Verdunstung der Flüssigkeiten. Jeder Testansatz beinhaltete auch gebrauchsfertige Positiv- (1. Anti-desmosomal; 2. Anti-hemidesmosomal) und Negativkontrollen. Nach der Inkubation wurden die Objektträger im Schwall mit PBS-Tween abgespült und für 5min in einer Küvette mit Hilfe eines Rotationsschüttlers in PBS-Tween gewaschen (1. Waschschrift). Zum Nachweis gebundener Antikörper wurde je Feld 25µl lichtempfindliches Fluorescein-markiertes Anti-Human-IgG (Ziege) aufgetragen und erneut für 30min bei Raumtemperatur unter Vermeidung direkter Sonneneinstrahlung inkubiert. Es folgte ein zweiter Waschschrift (siehe oben). Nach dem Eindecken der Objektträger mit Glycerol und Deckglas erfolgte die Beurteilung der Fluoreszenz am EUROStar II Plus Fluoreszenzmikroskop (*Euroimmun AG, Lübeck*) mit 20x Objektiv.

Spezifische Fluoreszenz bei der Verdünnung von 1:10 wurde, wie im Testprotokoll empfohlen, als positiv bewertet (Abbildung 2.1). Zum Erlernen der spezifischen Fluoreszenzmuster wurden vor Analyse der Blutspender einzelne Proben von Patienten mit klinisch manifesten bullösen Autoimmundermatosen (Bullöses Pemphigoid, Pemphigus vulgaris, Epidermolysis bullosa aquisata) mit diesem Testsystem untersucht. Lineare IgG-Ablagerung in der dermo-epidermalen Junktionszone des Ösophagus, epidermale IgG-Ablagerung in der Spalthaut, Anti-BP180 und/oder Anti-BP230 Reaktivität sind typische IIF Eigenschaften des BP (Abbildung 2.1, A-D) [168]. Interzelluläre epidermale IgG-Ablagerung im Ösophagus, sowie Anti-Dsg1 und/oder Anti-Dsg3 Reaktivität werden den Pemphiguserkrankungen zugeordnet (Abbildung 2.1, E-G) [168]. Alle Plasmaproben mit positiver spezifischer Fluoreszenz, ebenso wie Positiv- und Negativkontrollen des entsprechenden Testansatzes, wurden am Mikroskop Olympus BX 40 (*Olympus Deutschland GmbH, Hamburg*) im Autoimmunlabor der Klinik für Dermatologie, UKSH Lübeck fotografisch dokumentiert. Dazu wurden die Kamera ProgRes C10^{plus} (*Jenoptik AG, Jena*) und die Fotosoftware ProgRes Capture Pro 2.1 (*Jenoptik AG, Jena*) genutzt.

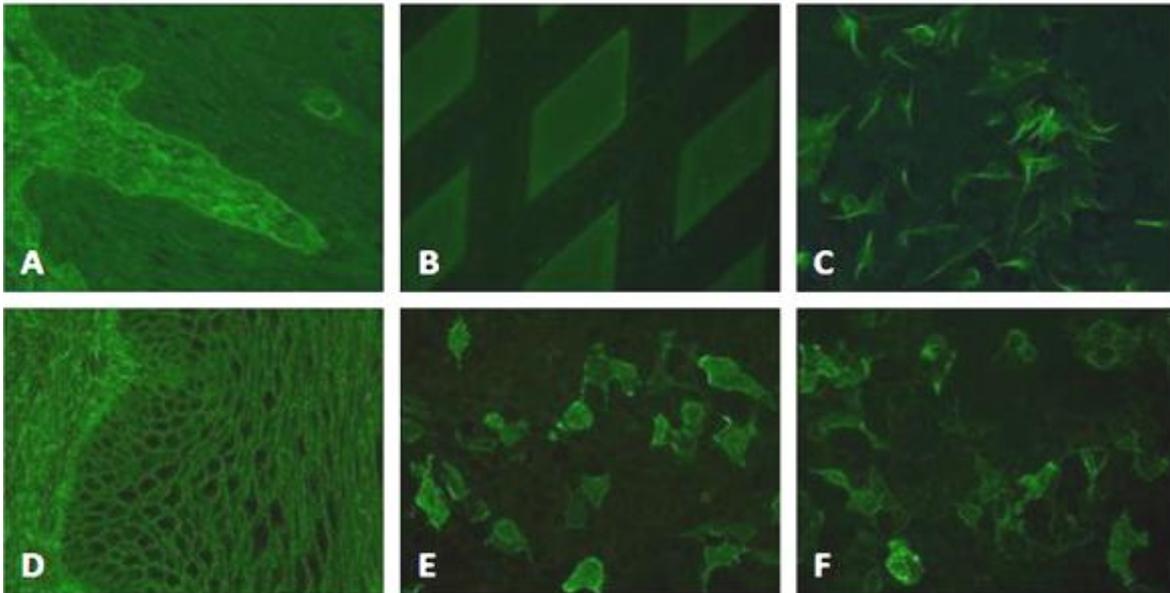


Abbildung 2.1: Pempfigoid- und Pempfigus-typische indirekte Immunfluoreszenzmuster.

Das Screening zum Nachweis von Autoantikörpern gegen Hautstrukturproteine wurde mittels Biochip basiertem IIF Mosaik durchgeführt. Hier dargestellt sind Gewebeschnitte aus Primatenösophagus (A, D), antigenträgende Felder mit rekombinantem BP180-NC16A (B) und transfizierte HEK293 Zellen, welche BP230gC (C), Dsg1 (E) oder Dsg3 (F) exprimieren. Lineare IgG-Ablagerung in der dermo-epidermalen Junktionszone des Ösophagus (A), Anti-BP180 (B) und/oder Anti-BP230 (C) Reaktivität sind typische IIF Muster des Bullösen Pemphigoid. Interzelluläre epidermale IgG-Ablagerung im Ösophagus (D), Anti-Dsg1 (E) und/oder Anti-Dsg3 (F) Reaktivität werden den Pemphiguserkrankungen zugeordnet. Alle Fotos stammen von positiven Proben der hier untersuchten Kohorte.

2.4.2 Evaluation mittels ELISA

Alle IIF positiven Proben mit Nachweis von Autoantikörpern gegen rekombinante Hautstrukturproteine wurden mit entsprechenden ELISAs evaluiert. Zeigte eine Probe z.B. eine positive Anti-BP180 Reaktion in der IIF, so wurde sie zusätzlich mit dem Anti-BP180-NC16A-ELISA (*Euroimmun AG, Lübeck*) untersucht. Zur quantitativen in vitro Bestimmung von IgG-Antikörpern dienten der Anti-BP180-NC16A-ELISA, Anti-BP230-CF-ELISA, Anti-Dsg-1-ELISA und Anti-Dsg3-ELISA (alle *Euroimmun AG, Lübeck*). Ausgewählte Testcharakteristika dieser ELISA-Testsysteme sind anhand der Angaben des Herstellers in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Ein positiver Antikörpernachweis wurde als Überschreitung der unteren Nachweisgrenze definiert. Die im Protokoll empfohlenen Cut-Offs für die Diagnose blasenbildender Autoimmundermatosen wurden bewusst nicht berücksichtigt, da in dieser Arbeit keine Krankheit diagnostiziert werden sollte.

Ferner wurden für jedes der relevanten Antigene eine vergleichbare Anzahl an IIF Negativen auch im ELISA getestet, um die Auswertung der IIF Mikroskopie zu validieren.

Tabelle 2.1: Testcharakteristika der verschiedenen ELISA-Testsysteme.

ELISA	Anti-BP180-NC16A	Anti-BP230-CF	Anti-Dsg1	Anti-Dsg3
untere Nachweisgrenze	0,6 RE/ml	1,0 RE/ml	0,5 RE/ml	0,3 RE/ml
Linearität*	10 - 199 RE/ml	17 - 190 RE/ml	9 - 197 RE/ml	14 - 195 RE/ml
Reproduzierbarkeit				
Intra-Assay-Variationskoeffizient**§	1,2 - 3,0%	3,0 - 5,0%	3,1 - 4,0%	2,6 - 5,9%
Inter-Assay-Variationskoeffizient***#	2,6 - 4,8%	3,4 - 6,8%	3,7 - 6,0%	3,3 - 6,1%

* Linearität durch vier serielle Verdünnungen sechs verschiedener Serumproben bestimmt; mindestens im angegebenen untersuchten Bereich linear. ** Variationskoeffizienten liegen vier verschiedene Serumproben für Anti-BP180-ELISA, Anti-BP230-ELISA (bzw. drei für Anti-Dsg1-ELISA, Anti-Dsg3-ELISA) zugrunde. § Ermittelt durch 20 Bestimmungen in einem Testansatz. # Ermittelt durch jeweils vier Bestimmungen in sechs verschiedenen Testansätzen.

Das Standardprotokoll des Herstellers galt für alle vier Assays (siehe Abbildung 7.2 im Anhang). Fast alle benötigten Verbrauchsmaterialien befanden sich in den Testpackungen. Die Assays ermöglichten das einzelne Bestücken der Rahmenplatten mit der benötigten Anzahl an Reagenzgefäßen. Zu Beginn wurden die 1:101 mit Probenpuffer verdünnten Plasmaproben sowie gebrauchsfertige Positiv- und Negativkontrollen zu je 100µl in einzelne Antigen-beschichtete Reagenzgefäße pipettiert. Um eine quantitative Auswertung zu ermöglichen, wurden pro ELISA-Platte drei Kalibratoren (2, 20 und 200 RE/ml humanes IgG) verwendet. Jede Probe wurde nur einmal getestet (Einzelbestimmung). Die Probeninkubation fand bei Raumtemperatur für 30min unter Verschluss der Platten mit ELISA/EIA-Verschlussfolie statt.

Danach folgte der 1. Waschschrift: Dafür wurde der mitgelieferte Waschpuffer zunächst 1:10 mit Aquadest (*Apotheke UKSH, Lübeck*) verdünnt. Nach Entleerung der Reagenzgefäße folgten drei Waschzyklen. Pro Zyklus wurden je 300µl verdünnter Waschpuffer für 30-60s inkubiert und danach ausgeschüttet. Nach dem dritten Zyklus wurde die Mikrotiterplatte mit Öffnung nach unten kräftig auf Fließpapier ausgeschlagen, um Flüssigkeitsreste zu vermeiden.

Zur Detektion gebundener Antikörper wurden anschließend 100µl Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgG (Kaninchen) in die einzelnen Reagenzgefäße pipettiert und erneut für 30min bei Raumtemperatur unter Verschluss inkubiert (Konjugatinkubation). Nach Durchführung des 2. Waschschrifts (siehe oben) folgte der Zusatz von 100µl Chromogen-Substratlösung (TMB/H₂O₂) für 15min bei Raumtemperatur unter Schutz vor direkter Sonneneinstrahlung (Substratinkubation). Durch Zugabe von 100µl 0,5M Schwefelsäure (H₂SO₄) wurde der durch gebundene Peroxidase-markierte Anti-Human-IgGs katalysierte Farbumschlag gestoppt.

Zuletzt wurde die Extinktion der Farblösung photometrisch (Opsys MR Microplate Reader; *Dynex Technologies GmbH, Denkendorf*) gemessen. Anhand der Kalibratoren konnte durch die Relevation QuickLink Software 24077 (*Dynex Technologies GmbH, Denkendorf*) die Extinktion der einzelnen Proben in relative Einheiten (RE/ml) umgerechnet werden. Für relative Enzymaktivitäten unter 1 RE/ml war die Software nicht in der Lage, exakte Werte zu berechnen, sodass all jene Proben auf <1 RE/ml gesetzt wurden.

2.5 Analyse der Überlappung verschiedener krankheitsspezifischer Autoantikörper

Zur Untersuchung der Kookkurrenz multipler Autoantikörper in gesunden Individuen sollten die Häufigkeiten verschiedener weiterer Antikörper in ANA Positiven und ANA Negativen verglichen werden.

Die Punktprävalenz jener weiteren Autoantikörper wurde zunächst in 1.000 (bzw. 369) zufällig ausgewählten, zuvor auf Pemphigus- und Pemphigoid-assoziierten Antikörpern getesteten Plasmaproben (Proben-ID Nr. 8707 - 9707) bestimmt. Alle 1.000 Proben wurden auf Organ-unabhängige Antikörper, die mit rheumatoider Arthritis (Anti-CCP) und ANCA-assoziierten Vaskulitiden (ANCA) in Verbindung gebracht werden, getestet; 369 davon zusätzlich auf Organ-spezifische Antikörper, die mit Autoimmunthyreopathien (Anti-TPO), Perniziöser Anämie (Anti-PCA) oder anderen Autoimmunendokrinopathien assoziiert sind.

Zeitgleich zu dieser Forschungsarbeit fand auch die Bestimmung von Antinukleären Antikörpern (ANA) durch Jasper Prüßmann in diesen 1.000 sowie in weiteren 5.455 Blutspendern statt. Um jene ANA mit einer spezifischen Krankheit in Verbindung bringen zu können, berücksichtigte dieses Screening SLE-typische ANA Muster. Dazu zählen nuklear homogen, nukleär granulär, nukleär grobgranulär mit negativen Nukleoli, few nuclear dots sowie cytoplasmatischer Golgi-Apparat [67, 124]. Angaben zur Methodik der ANA-Bestimmung sind der gemeinsamen Publikation Prüßmann et al. zu entnehmen [137]. Alle 6.455 auf ANA untersuchten Personen waren auch Teil der 7.063 auf Antikörper gegen Hautstrukturproteine gescreenten Blutspender.

Für die Analyse der Kookkurrenz anderer Autoantikörper mit ANA stellte Jasper Prüßmann Informationen über die ANA Positivität der Spender zur Verfügung. Insgesamt waren 38 Proben innerhalb der 1.000 mit einem Titer $\geq 1:320$ ANA positiv. Zusätzliche 177 ANA positive Proben (aus 5.455 Blutspendern, Titer $\geq 1:320$) wurden auf Anti-CCP, ANCA, Anti-TPO, Anti-PCA und Autoantikörper gegen weitere endokrine Organe untersucht. Durch den hoch gewählten ANA Einschlusstiter von $\geq 1:320$ sollte die Anzahl falschnegativer und falschpositiver Proben minimiert werden. Die Anzahl der benötigten ANA Positiven zum statistisch signifikanten Nachweis möglicher Antikörperüberlappungen richtete sich nach der zuvor durchgeführten Power Calculation (siehe Kapitel 2.6). Abbildung 2.2 fasst das Studiendesign zusammen.

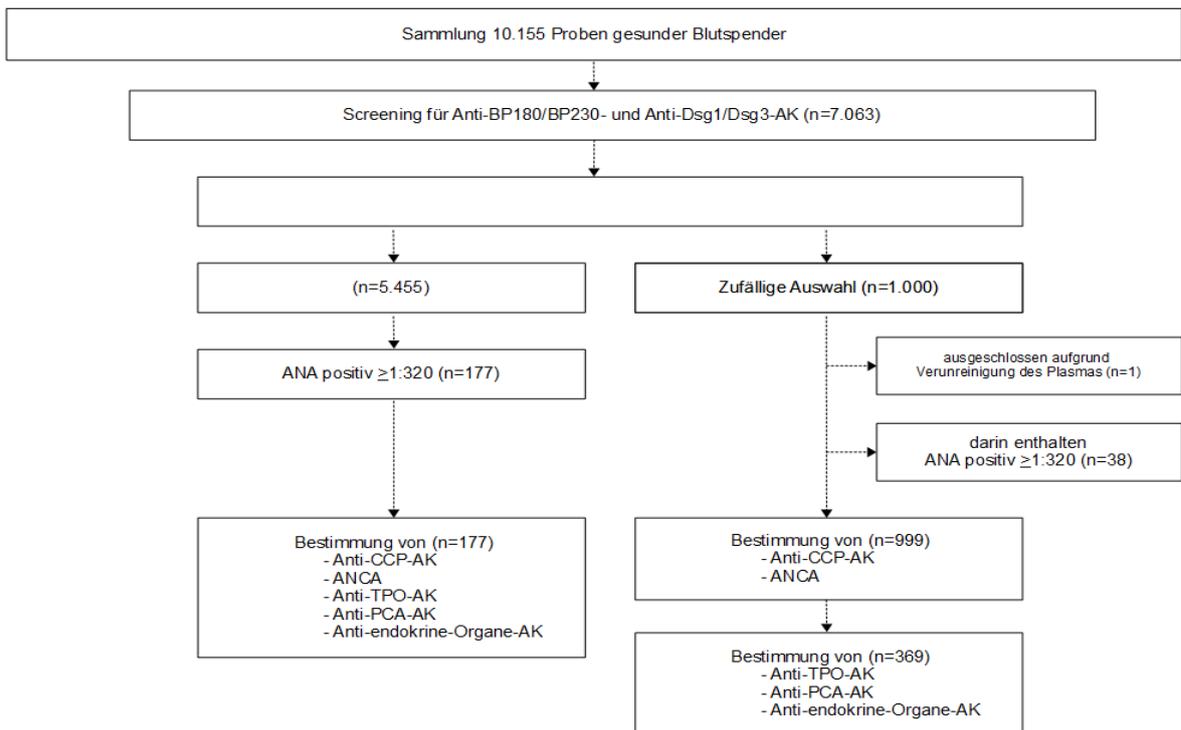


Abbildung 2.2: Darstellung des Studiendesign zur Bestimmung multipler Autoantikörper in Gesunden.

ANA Screening durchgeführt von Jasper Prüßmann.

2.5.1 Anti-CCP-Antikörper

IgG-Antikörper gegen cyclische citrullinierte Peptide wurden mit dem Anti-CCP-ELISA (IgG) (*Euroimmun AG, Lübeck*) quantitativ nachgewiesen. Der Assay wurde nach Standardprotokoll des Herstellers durchgeführt. Das Protokoll glich den Arbeitsanleitungen, der zum Nachweis von Antikörpern gegen Hautstrukturproteinen verwendeten ELISAs bis auf wenige Ausnahmen (wie unter Kapitel 2.4.1 beschrieben; siehe Abbildung 7.2 im Anhang). Folgende Unterschiede bestanden: Pro ELISA-Platte wurden fünf Kalibratoren (1, 5, 20, 100 und 200 RE/ml humanes IgG) verwendet; die Probeninkubation fand für 60 min, die Substratinkubation für 30 min statt. Ausgewählte Testcharakteristika des Anti-CCP-ELISA sind anhand der Angaben des Herstellers in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Tabelle 2.2: Testcharakteristika des Anti-CCP-ELISA.

untere Nachweisgrenze	Cut-Off für Diagnostik der RA ^{&}	Linearität*	Reproduzierbarkeit	
			Intra-Assay-Variationskoeffizient ^{**§}	Inter-Assay-Variationskoeffizient ^{**#}
0,3 RE/ml	5 RE/ml	3 - 196 RE/ml	3,4 - 5,9%	6,3 - 7,2%

[&] Empfehlung für die Diagnose von Patienten mit Rheumatoider Arthritis. * Linearität durch serielle Verdünnung sechs verschiedener Serumproben bestimmt; mindestens im angegebenen untersuchten Bereich linear. ** Variationskoeffizienten liegen vier verschiedene Serumproben zugrunde. [§] Ermittelt durch 20 Bestimmungen in einem Testansatz. [#] Ermittelt durch jeweils vier Bestimmungen in sechs verschiedenen Testansätzen.

2.5.2 Autoantikörper gegen endokrine Organe

Für die qualitative in vitro Bestimmung von Autoantikörpern, die sich gegen endokrine Organe richten, wurde das kommerziell erwerbliche indirekte Immunfluoreszenz Testsystem Polyendokrinopathie-Mosaik (*Euroimmun AG, Lübeck*) verwendet. Dieses Biochip-basierte Verfahren enthielt pro Objektträger zehn Reaktionsfelder mit sechs verschiedenen Gewebeschnitten als Substrate: Schilddrüse, Magen, Pankreas, Nebenniere, Eierstock, Hoden (alle Affe). Tabelle 2.3 fasst die mit diesem IIF Test detektierbaren Zielantigene und deren assoziierte Krankheiten zusammen.

Tabelle 2.3: Nachweismöglichkeit von Autoantikörpern mit dem Polyendokrinopathie-Mosaik.

Gewebeschnitt	nachweisbarer Antikörper	Zielantigen(e)	Krankheit
Schilddrüse	MAk (Schilddrüsen-Mikrosomen-AK) TAK (Thyreoglobulin-AK).	TPO - Thyreoperoxidase TG - Thyreoglobulin	Hashimoto Thyreoiditis, M. Basedow
Magen	PCA (Parietalzell-AK)	H ⁺ /K ⁺ -ATPase	Autoimmungastritis, Perniziöse Anämie
Pankreas	ICA (Inselzell-AK)	GAD - Glutamat-Decarboxylase IA-2 - Tyrosin-Phosphatase	Typ 1 Diabetes mellitus
Nebenniere	Anti-Nebennierenrinden-AK	Steroid-21-Hydroxylase	autoimmun bedingter M. Addison
Eierstock	Anti-Theca-Zell-AK	diverse	Primäre Ovarinsuffizienz
Hoden	Anti-Leydig-Zell-AK	diverse	Hypergonadotroper Hypogonadismus

Die Durchführung der IIF erfolgte entsprechend des Standardprotokolls des Herstellers. Das Protokoll entsprach der Arbeitsanleitung des IIF Dermatologie-Mosaiks (wie unter Kapitel 2.4.1 beschrieben; siehe Abbildung 7.1 im Anhang). Die Markierung gebundener Antikörper fand in diesem Fall jedoch mit Fluorescein-konjugiertem Anti-Human-IgAGM (Ziege) statt, sodass verschiedene Antikörperklassen sichtbar wurden. Spezifische

Fluoreszenz bei einer Verdünnung von 1:10 wurde wie im Protokoll empfohlen als positiv gewertet (Abbildung 2.3).

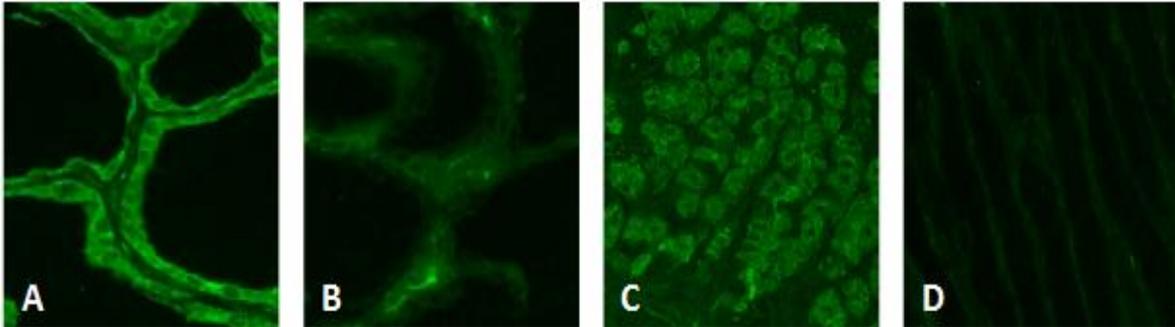


Abbildung 2.3: Nachweis von Anti-TPO und Anti-PCA Antikörpern mittels IIF.

Das Screening zum Nachweis von Autoantikörpern gegen endokrine Organe wurde mittels IIF Mosaik durchgeführt. Alle Kryoschnitte wurden aus Primatengewebe hergestellt. Hier dargestellt sind Schilddrüsen- (A, B) und Magenschleimhautgewebe (C, D). Die Abbildungen zeigen positive (A) und negative (B) Anti-TPO Reaktivität sowie positive (C) und negative (D) Anti-PCA Fluoreszenz. Alle Fotos stammen von Blutspendern der hier untersuchten Kohorte.

Proben mit positiver Fluoreszenz im Schilddrüsen- oder Magengewebeschnitt wurden zur Bestätigung erneut gefärbt. Diese Validierung fand im klinisch-immunologischen Referenzlabor, Prof. Winfried Stöcker statt; alle dort verwendeten Materialien wurden zur Verfügung gestellt. Es wurden unfixiertes Schilddrüsengewebe (Affe) bzw. mit Harnstoff vorbehandelte Magenschleimhaut (Affe) als Substrate verwendet. Die Harnstoffvorbehandlung der Magenschleimhaut ermöglichte die sichere Differenzierung von Anti-PCA-Antikörpern und Fluoreszenz verfälschenden Anti-mitochondrialen Antikörpern. Ebenso wurden dort Proben mit auffälliger, aber nicht eindeutiger, Fluoreszenz des Pankreasgewebes erneut getestet.

Die Färbungen wurden durch die Doktorandin (nach Standardprotokoll IIF des Herstellers wie unter Kapitel 2.4.1 beschrieben) unter Verwendung von FITC-markiertem Anti-Human-IgAGM (Ziege) selbst durchgeführt. Um eine höhere Sensitivität für die Detektion von Anti-Inselzell-Antikörpern zu erreichen, wurde das Plasma diesmal für 18h mit dem Substrat (Pankreasgewebe, Affe) vorinkubiert. Frau Manja Kowalke, Mitarbeiterin im Referenzlabor, wertete die Fluoreszenzmuster zur besseren Objektivierung aus.

2.5.3 ANCA

Der Nachweis von ANCAs in 1000 Plasmen gesunder Blutspender und 215 ANA positiven Proben (Titer \geq 1:320) wurde durch Dr. Elena Csernok im nationalen Referenzlabor für Vaskuliserkrankungen, Rheumazentrum Lübeck/Bad Bramstedt unter Vermittlung von Prof. Peter Lamprecht durchgeführt. Die Bestimmung der ANCAs erfolgte durch IIF und ELISA. In Kürze: In der IIF wurde die Antikörperbindung auf mit Plasmaproben inkubierten

Ethanol-fixierten Leukozyten durch Fluorescein-konjugiertes Anti-Human-IgG (Kaninchen) (*Dako, Hamburg*) nachgewiesen. Um zwischen p-ANCA und ANA differenzieren zu können, wurden Proben mit perinukleären/nukleären Fluoreszenzmustern weiterhin auf Formalin-fixierten Neutrophilen und HEp-2-Zellen untersucht. ANCA Titer über 1:20 galten als positiv [51]. Alle Proben wurden auch quantitativ auf PR3-ANCA und MPO-ANCA im ELISA (*Orgentec, Mainz*) getestet. Hierbei galten die für diagnostische Zwecke genutzten Cut-Offs von 10 RE/ml beziehungsweise 5 RE/ml.

2.5.4 Vergleich Autoantikörperprävalenz mit publizierter Krankheitsprävalenz

Um abzuschätzen, ob Autoantikörper in Gesunden häufiger als in Kranken auftreten, wurden die hier ermittelten Prävalenzen der Autoantikörper in Relation zu den Krankheitshäufigkeiten gesetzt. Hierfür wurden verschiedene epidemiologische Studien hinsichtlich Anzahl untersuchter Autoimmunkrankheiten und ethnischen Hintergrund der Population geprüft. Zum Vergleich sollte jene Studie ausgewählt werden, welche all jene Autoimmunkrankheiten umfasste, deren charakteristische Autoantikörper hier getestet wurden, und welche ethnisch am nächsten zur deutschen Population lag.

2.6 Statistik

Zur Auswertung der Antikörperpunktprävalenzen wurden aus relativer Häufigkeit (p), Gegenwahrscheinlichkeit (q) und Probenanzahl (n) der Standardfehler (SE_p), sowie obere bzw. untere 95% Konfidenzgrenze nach folgenden Formeln berechnet [86]: Eine Standardnormalverteilung der Daten wurde hierfür angenommen.

$$SE_p = \sqrt{\frac{p \times q}{n}} = \sqrt{\frac{p \times (1 - p)}{n}}$$

$$95\% \text{ Konfidenzgrenzen} = p \pm 1,96 \times SE_p$$

Die Berechnung eines hypothetisch positiv prädiktiven Werts (PPW) für das Erkrankungsrisiko nach positivem Antikörpertest wurde durch bereits publizierte Erkrankungsfrequenz ($f_{erkrankt}$) und hier ermittelte Autoantikörperhäufigkeit (f_{AAK}), bezogen auf die gesamte deutsche Bevölkerung (82 Mio. Einwohner), berechnet. Dabei wurde vereinfacht angenommen, dass f_{AAK} alle richtig Positiven (jene Individuen, die später erkranken) und falsch Positiven (jene Individuen, die gesund bleiben) beinhalten.

$$PPW = \frac{n_{\text{richtig positiv}}}{n_{\text{richtig positiv}} + n_{\text{falsch positiv}}} = \frac{f_{erkrankt} \times 82 \text{ Mio.}}{f_{AAK} \times 82 \text{ Mio.}}$$

Quantitative ELISA Werte zuvor mit indirekter Immunfluoreszenz getesteter IIF positiver und IIF negativer Proben wurden aufgrund der fehlenden Normalverteilung dieser Datensätze im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durch Gnu R (*Version 2.15*, <http://www.r-project.org>) verglichen.

Die Analyse binomialer Ereignisse möglicher Antikörperüberlappungen mit ANA erfolgte ebenso mit Gnu R. Hierfür wurden die Odds Ratios der Antikörperfrequenzen ANA Positiver und ANA Negativer verglichen. Das Zusatzpaket Clickfun (*Version 0.9.8*, <http://www.r-project.org>) ermöglichte die Ermittlung der Wilson Konfidenzintervalle. Zur Testung der statistischen Signifikanz wurde der für seltene Ereignisse geeignete Exakte Test nach Fischer verwendet (*Epitools, Version 0.5-6*, <http://www.r-project.org>). Im Falle multipler Testungen wurden die p-Werte nach der Benjamini-Hochberg Methode bereinigt. Die Adjustierung jener p-Werte wurde durch Dr. Andreas Recke, Klinik für Dermatologie, Universität zu Lübeck durchgeführt.

Im Vorfeld dieser Arbeit fand durch Dr. Andreas Recke eine Fallzahlschätzung und Power Kalkulation statt, um einzuschätzen, wie viele ANA positive Proben benötigt werden, damit eine mögliche Assoziation zwischen ANA und anderen Autoantikörpern detektierbar wäre. Für eine mögliche Assoziation von ANA und Anti-TPO-Antikörpern wurden für Anti-TPO-AAK Frequenzen von 4% in ANA Negativen und 11% in ANA Positiven (entspräche einer Odds Ratio von ca. 3) angenommen. Zum Nachweis dieser Antikörperüberlappung, ausgewertet mittels Exakten Test nach Fischer mit einer Power von 0,8, wären dafür mindestens 203 ANA Positive und 289 ANA Negative notwendig. Überlappungen zwischen ANA und selteneren Antikörpern würden bei gleicher Power eine größere Zahl an ANA Positiven benötigen. Da Anti-TPO Antikörpern von den hier untersuchten Autoantikörpern am häufigsten sind, wurde die Power Analyse auf diese abgestimmt. Ergebnisse hinsichtlich der Kookkurrenz von ANA mit anderen Autoantikörpern sind daher entsprechend zu interpretieren.

3 Ergebnisse

3.1 Häufigkeit von Pemphigus- und Pemphigoid assoziierten Autoantikörpern in Gesunden

3.1.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die IIF Mikroskopie offenbarte in 62 (N = 7.063) Blutspendern eine Reaktion mit einem der rekombinanten Substrate des Biochips für AIBD. Insgesamt ergab sich damit eine Punktprävalenz von 0,88% (95% KI 0,66-1,10%) der Autoantikörper, die gegen desmosomale und hemidesmosomale Strukturproteine der Haut gerichtet sind. Von diesen reagierten 0,21% (95% KI 0,11-0,32%) mit Dsg1, 0,10% (95% KI 0,03-0,17%) mit Dsg3, 0,52% (95% KI 0,36-0,69%) mit BP180-NC16A und 0,04% (95% KI 0,00-0,09%) mit BP230. Es konnten keine doppelt Positiven für mehrere rekombinante Antigene, wie BP180 und BP230 oder Dsg1 zusammen mit Dsg3, identifiziert werden.

Folglich fanden sich in 0,31% (95% KI 0,18-0,44%) der gesunden Blutspender Autoantikörper gegen Pemphigusantigene und in 0,56% (95% KI 0,39-0,74%) gegen Pemphigoidantigene, bei letzteren nahezu ausschließlich gegen BP180, das pathogenetisch relevante Epitope des Bullösen Pemphigoids [82, 113] (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Prävalenz von Pemphigus- und Pemphigoid Autoantikörpern in Gesunden.

Antigen	IIF Positive* [n]	IIF Positive* [%] (95% KI)	ELISA**		
			<1 RE/ml [n]	>1 - <20 RE/ml [n]	≥20 RE/ml [n]
Dsg1 [#]	15	0,21 (0,11-0,32)	8 {4}	6 {4}	1 {0}
Dsg3 [#]	7	0,10 (0,03-0,17)	1 {0}	6 {4}	0 {0}
BP180-NC16A [§]	37	0,52 (0,36-0,69)	2 {0}	19 {1}	16 {1}
BP230 [#]	3	0,04 (0,00-0,09)	1 {0}	2 {0}	0 {0}

* Von 7.063 getesteten Blutspendern. Angaben in {} Klammern entsprechen der Anzahl der Proben mit deutlich sichtbarer IgG-Ablagerung im Ösophagusgewebeschnitt. **Alle IIF positiven Proben wurden einbezogen (15 für Dsg1, 7 für Dsg3, 37 für BP180-NC16A, 3 für BP230). [#]Rekombinantes Antigen exprimiert auf transfizierten HEK Zellen. [§]Flächenhaft aufgetragenes, gereinigtes rekombinantes Protein.

Trotz deutlich sichtbarer IIF Reaktivität gegenüber den rekombinanten Antigenen des Biochips fehlte häufig eine eindeutig sichtbare Immunglobulinablagerung in den Gewebeschnitten. So zeigten nur 5% aller BP180/BP230 positiven Proben eine lineare IgG-Ablagerung in der dermo-epidermalen Junktionszone des Ösophagus und keine Probe ein IgG-Deposit im Blasendach der Spalthaut. Hingegen fand sich in 55% aller Dsg1/Dsg3 positiven Proben eine interzelluläre epidermale IgG-Ablagerung im Ösophagus.

3.1.2 ELISA

Zur Evaluation der IIF Auswertung wurden alle IIF Positiven sowie eine vergleichbare Anzahl an IIF Negativen mit antigenspezifischen Anti-IgG-ELISA untersucht. Die ELISAs ermöglichten ebenso die Quantifizierung der vorhandenen Antikörpermengen.

Die Präsenz von Autoantikörpern gegen Hautstrukturproteine in Gesunden war auch mittels ELISAs feststellbar, wobei diese insgesamt niedrige Extinktionswerte zeigten. In 35 von 37 Anti-BP180 IIF positiven Proben konnte auch eine Reaktivität im Anti-BP180-NC16A ELISA nachgewiesen werden. Bemerkenswerterweise wiesen 16 von diesen Messwerte ≥ 20 RE/ml auf; jenem Cut-off mit bester Spezifität und Sensitivität für die Diagnosestellung des Bullösen Pemphigoids. Dabei überschritten 9 der Anti-BP180 IIF positiven Proben diesen Cut-off deutlich mit gemessenen Antikörperaktivitäten zwischen 60 RE/ml bis zu 200 RE/ml. Im Falle der Anti-BP230 IIF positiven Proben zeigten zwei von drei ELISA Werte über 1 RE/ml. Hingegen reagierte nur die knappe Hälfte der 15 Anti-Dsg1 IIF Positiven auch im ELISA positiv, wobei Werte bis 103 RE/ml bestimmt wurden, jedoch 8 Proben Enzymaktivitäten unterhalb 1 RE/ml hatten. Anders innerhalb der Anti-Dsg3 IIF Positiven, bei denen 6 aus 7 messbare Antikörper im ELISA aufzeigten (siehe Tabelle 3.1). Den zum Vergleich mitgeführten IIF negativen Blutspendern fehlte jegliche ELISA Reaktivität für die Zielantigene Dsg1 und BP230. Einige wenige reagierten mit niedrigen Enzymaktivitäten im Anti-BP180-NC16A (bis 11 RE/ml) bzw. Anti-Dsg3 (bis 3 RE/ml) ELISA.

Insgesamt wiesen Anti-BP180, Anti-Dsg1 und Anti-Dsg3 IIF Positive beim Vergleich der Verteilung ihrer ELISA Messergebnisse mit IIF negativen Proben hochsignifikant höhere ELISA Werte auf ($p < 0,001$). Dieser Unterschied der Extinktionswerte ließ sich auch bei den Anti-BP230 IIF Positiven und Negativen mit geringerer Signifikanz wiederfinden ($p < 0,05$) (siehe Abbildung 3.1).

Die Höhe der im ELISA gemessenen Antikörperkonzentrationen stand in keinem Zusammenhang mit dem Vorhandensein einer deutlich sichtbaren IgG-Ablagerung in den Gewebeschnitten. Sowohl bei Proben mit fehlender, niedriger als auch höherer ELISA Reaktivität waren IgG Ablagerungen im Ösophagusgewebeschnitt der IIF erkennbar.

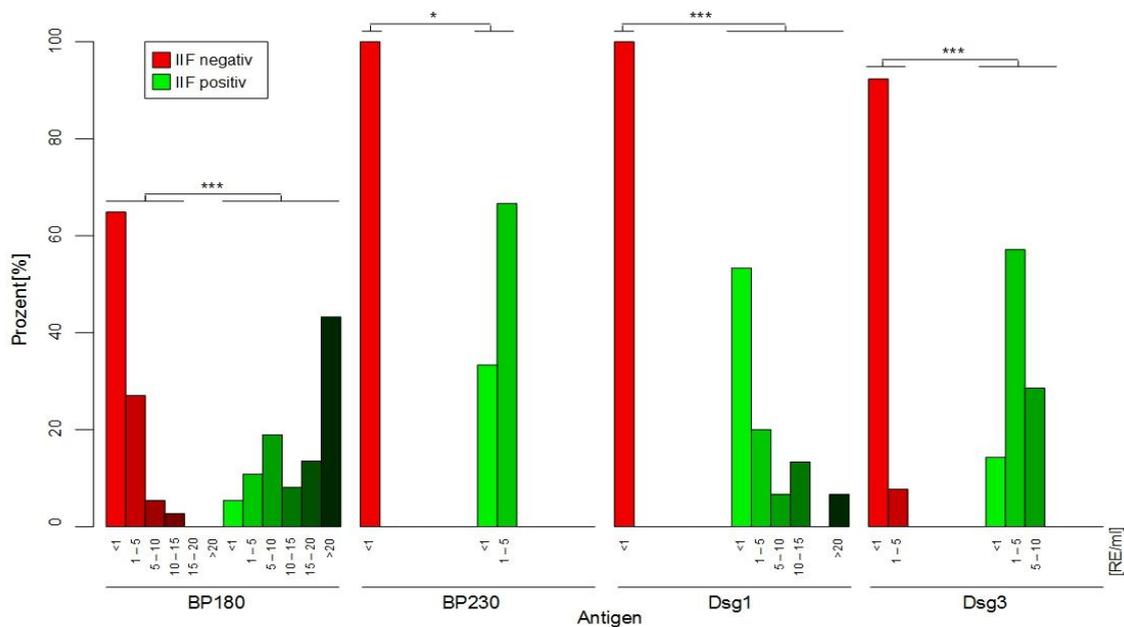


Abbildung 3.1: IIF Positive zeigten signifikant höhere ELISA Werte als IIF Negative.

Dieses Balkendiagramm stellt den prozentualen Anteil IIF positiver (grün) und IIF negativer (rot) Proben in Abhängigkeit von ihrem gemessenen ELISA Wert dar. Die Messwerte wurden aufgrund fehlender Normalverteilung mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verglichen. Anti-BP180-NC16A, Anti-BP230gC, Anti-Dsg1 als auch Anti-Dsg3 IIF positive Proben hatten signifikant höhere ELISA Werte als IIF negative Proben. Alle IIF Positiven [ebenso n IIF Negative] wurden einbezogen: 37 [37] für BP180-NC16A, 3 [9] für BP230, 15 [27] für Dsg1 und 7 [13] für Dsg3. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.2 Prävalenz weiterer getesteter Autoantikörper in Gesunden

In 999 (bzw. 369 auf Autoimmunendokrinopathien) getesteten zufällig ausgewählten Blutspendern ließen sich weitere Organ-spezifische (Anti-TPO, Anti-PCA) sowie Organ-unspezifische (Anti-CCP, ANCA) Autoantikörper nachweisen. Am häufigsten fanden sich Anti-TPO Antikörper mit einer Prävalenz von 4,6%, gefolgt von Anti-CCP (1,3%), Anti-PCA (1,1%) und ANCA (0,3%) (Tabelle 3.2). In Tabelle 3.2 sind nur Anti-CCP Antikörper mit Enzymaktivitäten ≥ 5 RE/ml einbezogen. Erweitert man dies auf jegliche nachweisbare Enzymaktivität (≥ 1 RE/ml) kämen 21,1% Anti-CCP Positive zusammen, wobei 2/3 jener nur Messwerte zwischen 1 - 2 RE/ml aufwiesen. In dieser Kohorte gesunder Blutspender konnten mittels IIF Screening keine Antikörper gegen Pankreas-, Nebennieren-, ovarielle oder testikuläre Zielantigene gefunden werden.

Tabelle 3.2: Prävalenz weiterer getesteter Autoantikörper in Gesunden.

Autoantikörper gegen	verwendete Methode	Anzahl Positiver (Gesamt) [n (N)]	Prozentsatz Positiver [%]	95% Konfidenzintervall
TPO	IIF	17 (369)	4,61	2,47 - 6,75
PCA	IIF	4 (369)	1,08	0,03 - 2,14
CCP	ELISA	13 (999)	1,30	0,60 - 2,00
p- und c-ANCA	IIF + ELISA	3 (999)	0,30	0,00 - 0,64
Alle AAK + ANA \geq 1:320 **	IIF bzw. ELISA	53 (369)	14,36	10,78 - 17,94
Alle AAK + ANA \geq 1:100 **	IIF bzw. ELISA	58 (369)	15,72	12,00 - 19,43
Alle AAK + ANA \geq 1:100 ##	IIF bzw. ELISA	75 (369)	20,33	16,22 - 24,43

** ANA mit SLE-spezifischen Fluoreszenzmustern. ## ANA ohne Einschränkung des Fluoreszenzmusters.

Insgesamt wurden 369 Blutspender auf sämtliche in dieser Arbeit beschriebenen Autoantikörper (BP180/230, Dsg1/3, CCP, ANCA, TPO, PCA, AK anderer Autoimmunendokrinopathien) getestet und zusätzlich durch Jasper Prüßmann auf die Präsenz von ANA untersucht. Die im Folgenden aufgeführten kumulierten Häufigkeiten beziehen sich im Falle der Antikörper gegen Hautstrukturproteine auf die IIF Ergebnisse. Bei Betrachtung dieser Subpopulation (n = 369) reagierten unter Annahme der ANA Positivität mit SLE-typischen Fluoreszenzmustern (Titer \geq 1:320) insgesamt 14,4% (95% KI 10,8-17,9%) der Proben in mindestens einem der durchgeführten Antikörpertests positiv. Ähnliches gilt für ANA Titer \geq 1:100, wobei in 15,7% (95% KI 12,0-19,4%) der Spender mindestens ein Autoantikörper nachgewiesen werden konnte. Bei Ausweitung auf jegliche ANA Reaktivität (\geq 1:100), die sowohl SLE-typische wie SLE-untypische Fluoreszenzmuster beinhaltete, waren es sogar 20,3% (95% KI 16,2-24,4%) aller Blutspender. Somit fiel jeder fünfte Gesunde als Träger mindestens eines krankheitsspezifischen Autoantikörpers auf.

3.2.1 Prävalenzvergleich von Autoantikörpern und zugehörigen Erkrankungen

Alle getesteten Autoantikörper wurden häufiger gefunden als die Häufigkeiten der zugehörigen Krankheiten vermuten ließen. So war die Frequenz fast aller Autoantikörper 20 bis 75 Mal größer als die publizierte Prävalenz der assoziierten Erkrankung (Tabelle 3.3). Beispielsweise fanden sich BP180/BP230 38-mal und Dsg1/Dsg3 positive Gesunde 75-mal häufiger als es Patienten mit BP bzw. Pemphiguserkrankungen gibt.

Die Krankheitsprävalenzen wurden für diesen Vergleich den epidemiologischen Daten von Eaton et al. entnommen [59]. Diese dänische Studie bestimmte durch Nutzung der Nationalen Krankenhauskartei, in der alle medizinischen Diagnosen personengebunden seit 1977 gesammelt werden, die Lebenszeitprävalenz 31 verschiedener Autoimmunerkrankungen in Bezug auf die gesamte dänische Bevölkerung. Dabei wurde die Lebenszeitprävalenz anhand des Anteils der Bevölkerung definiert, der bei Datenerhebung 2001 aktuell unter einer Autoimmunkrankheit leidet oder zuvor litt.

Interessanterweise stimmten nur im Falle der Anti-CCP-AK die Häufigkeiten von Autoantikörper und Krankheit genauer überein. Die in dieser Arbeit ermittelte Prävalenz von 1,3% lag lediglich 2 bis 3 Mal so hoch wie die Prävalenz der Rheumatoiden Arthritis, welche zwischen 0,4% bis 1% angegeben wird [59, 163]. Zieht man in Betracht, dass ca. 75% aller RA Patienten seropositiv für Anti-CCP-Antikörper sind, so wäre diese Ratio nur unwesentlich höher [138].

Tabelle 3.3: Autoantikörper in Gesunden sind deutlich häufiger nachweisbar als die Frequenz assoziierter Erkrankungen.

Autoantikörper gegen	Autoantikörper Prävalenz [%]	assozierte Krankheit(en)	Krankheits-Prävalenz* [%]	Prävalenz Ratio	PPW** [%]
BP180/ BP230	0,6	Bullöses Pemphigoid	0,016	37,5	2,7
Dsg1/3	0,3	Pemphiguserkrankungen	0,004	75,0	1,3
CCP	1,3	Seropos. Rheumatoide Arthritis	0,381	3,4	29,2
ANCA [§]	0,3	ANCA-assozierte Vaskulitiden	0,010	30,0	3,3
TPO	4,6	Hashimoto's Thyreoditis	0,062	74,2	1,3
PCA	1,1	Perniziöse Anämie	0,054	20,3	4,9

*Die angegebenen Krankheitsprävalenzen wurden der epidemiologischen Studie von Eaton et al. entnommen [59]. **Berechnung des hypothetischen PPW für das Risiko krank zu werden, wie unter Kapitel 2.6 beschrieben. [§]p- oder c-ANCA positive Proben.

3.3 Kookkurrenz von ANA und anderen Autoantikörpern in Gesunden

Um eine mögliche Assoziation des zeitgleichen Auftretens multipler krankheitsspezifischer Autoantikörper in Gesunden untersuchen zu können, wurden die Frequenzen der getesteten Autoantikörper in ANA Positiven (Titer $\geq 1:320$) und ANA Negativen aus der Gesamtheit der getesteten Proben miteinander verglichen.

Erstaunlicherweise war das Auftreten von Anti-CCP, Anti-TPO und Anti-Dsg1/3 Autoantikörpern überzufällig häufig mit ANA assoziiert. So lagen die ermittelten Prävalenzen der Anti-TPO (OR 2,4, adj. $p < 0.05$), Anti-Dsg1/Dsg3 (OR unendlich, adj. $p < 0.01$) und Anti-CCP (OR 3,2, adj. $p < 0.05$) Antikörper in ANA positiven Proben signifikant höher als in ANA Negativen (Tabelle 3.4).

Die statistisch signifikant höhere Frequenz der Anti-CCP Antikörper in ANA Positiven wurde hierbei auf Grundlage des Schwellenwertes von 5 RE/ml berechnet. Ein ferner durchgeführter Vergleich aller gemessenen Anti-CCP-ELISA Enzymaktivitäten ANA Positiver versus ANA Negativer bestätigte dieses Ergebnis zudem. Übereinstimmend mit der erhöhten Frequenz wurden auch signifikant höhere ELISA Werte für Anti-CCP Antikörper in ANA Positiven gefunden ($p < 0,001$; Abbildung 3.2).

Hingegen unterschieden sich die Häufigkeiten der Anti-BP180/BP230 und Anti-PCA Antikörper nicht signifikant zwischen ANA positiven und ANA negativen Blutspendern. ANCA fanden sich seltener in der Subpopulation der ANA Positiven als bei ANA Negativen.

Es ließen sich keine weiteren signifikanten Antikörperüberlappungen außer den genannten Kombinationen mit ANA aufdecken. Unter Ausschluss der ANA, konnte nur einmalig das zeitgleiche Auftreten von Autoantikörpern, in jenem Fall Anti-TPO und Anti-PCA, beobachtet werden. Diese Arbeit war jedoch nicht konzipiert, um Antikörperüberlappungen außer mit ANA zu detektieren (siehe Kapitel 2.6). Hier sind mögliche Antikörperassoziationen nicht sicher auszuschließen.

Tabelle 3.4: Assoziation verschiedener Autoantikörper mit ANA.

Autoantikörper gegen	ANA negativ		ANA positiv*		Odds Ratio	unadjustierter p-Wert**	adjustierter p-Wert#
	n (N)	%	n (N)	%	OR (95% CI)		
BP180/BP230	6 (949)	0,63	3 (215)	1,40	2,2 (0,3 - 10,4)	0,3806	0,5693
Dsg1/Dsg3	0 (949)	0,00	4 (215)	1,86	Inf (2,9 - Inf)[§]	0,0012	0,0072
CCP	11 (949)	1,16	8 (215)	3,72	3,2 (1,1 - 8,9)	0,0157	0,0432
ANCA [§]	3 (949)	0,32	0 (215)	0,00	0,0 (0,0 - 10,7)	1	1
TPO	13 (346)	3,76	18 (200)	9,00	2,4 (1,1 - 5,4)	0,0216	0,0432
PCA	4 (346)	1,16	4 (200)	2,00	1,7 (0,3 - 9,4)	0,4744	0,5693

* ANA Titer $\geq 1:320$ sowie SLE-typische Fluoreszenzmuster. **Unadjustierte p-Werte wurden mittels Exaktem Test nach Fischer kalkuliert. #Adjustierte p-Werte wurden unter Berücksichtigung multipler Testungen nach Benjamini und Hochberg berechnet. [§]Aufgrund der Division mit Null ergab sich eine unendlich Odds Ratio. [§]p- oder c-ANCA positive Proben.

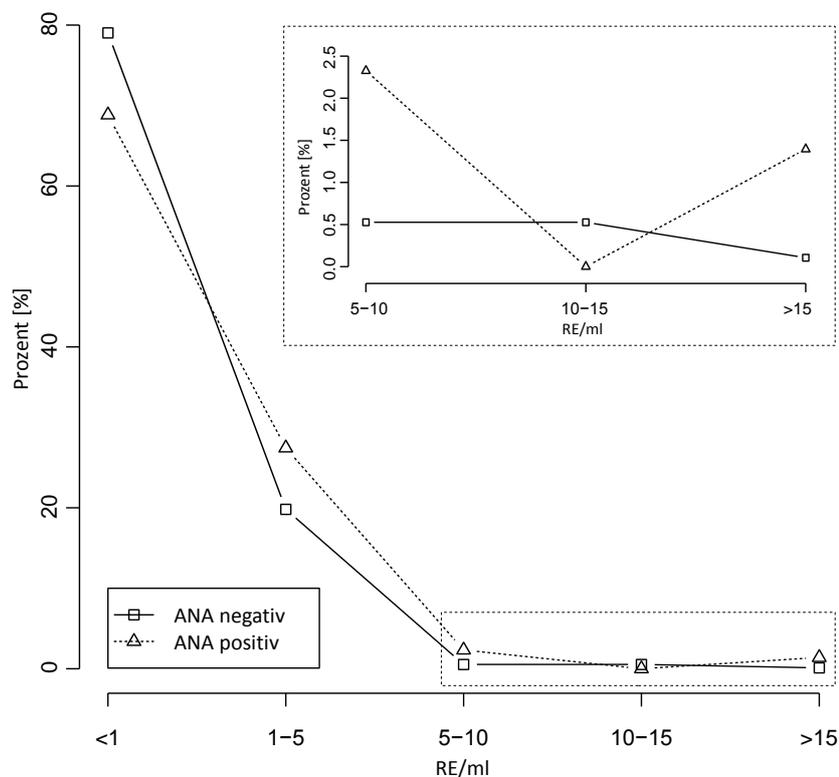


Abbildung 3.2: ANA Positive hatten signifikant höhere Anti-CCP-ELISA Werte als ANA Negative.

Hierbei wurde die Verteilung der ELISA Messergebnisse ANA positiver (Titer $\geq 1:320$) und ANA negativer Proben mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test miteinander verglichen ($p < 0.001$). Der eingeschobene Ausschnitt stellt die Verteilung der ELISA Werte über 5 RE/ml detaillierter dar.

4 Diskussion

4.1 Blutspender

Alle hier durchgeführten Tests basieren auf der Annahme, dass die untersuchten Blutspender gesunde Erwachsene sind. Aufgrund der Einschränkung des Ethikvotums wurden alle Blutproben sofort nach Entnahme anonymisiert. Deswegen sind leider keinerlei Informationen über Alter, Geschlecht, Blutspendeverhalten (Neuspender, Gelegenheitsspender, regelmäßiger Spender), Gesundheitsstatus oder Familienanamnese der einzelnen Spender vorhanden. Auch ist eine prospektive Verlaufskontrolle der Probanden hinsichtlich möglicher Krankheitsmanifestation nicht möglich.

4.1.1 Gesundheitsstatus

Blutspender gelten als gesunde Erwachsene. Durch eng festgelegte Ein- und Ausschlusskriterien der Richtlinie der Bundesärztekammer wird ihre Gesundheit vor Spende vorausgesetzt. So zählen zu den dauerhaften Ausschlusskriterien beispielsweise: schwere neurologische, kardiologische oder den Spender bzw. Empfänger gefährdende chronische Erkrankungen, bösartige Neoplasien, Allergien, Infektionskrankheiten (wie z.B. HIV, HBV, HCV, Syphilis, chronisch persistierende bakterielle u.a.), Drogen- und Medikamentenmissbrauch oder sexuelles Risikoverhalten (siehe Anhang Abschnitt 7.3) [38]. Neben diesen offensichtlichen Gefahren gibt es jedoch auch eine Vielzahl in unterschiedlichem Ausmaß zeitlich begrenzten Rückstellungskriterien, welche Infektionsrisiken bergen. Hierzu zählen unter anderem stattgehabte Durchfallerkrankungen, unkomplizierte Infekte, Reisen in Malariagebiete, Lebendimpfungen, Tätowierungen oder Stechen von Piercings (siehe Anhang Abschnitt 7.3) [38]. Auch in der hier durchgeführten Arbeit wurde vor jeder Blutentnahme die Tauglichkeit durch Fragebogen-assistierte Anamnese, orientierende körperliche Untersuchung und laborchemische Diagnostik neu bestimmt.

In Deutschland spenden schätzungsweise ca. 40% aller Einwohner Blut [189]. Aufgrund dieses hohen Anteils bot die Untersuchung von Blutspendern einen guten Querschnitt durch unsere gesunde Gesellschaft und eignete sich für die repräsentative Bestimmung der Häufigkeit krankheitsspezifischer Autoantikörper in Gesunden.

4.1.2 Soziodemographische Eigenschaften

Die Altersverteilung der hier untersuchten Blutspender lag wie in den Richtlinien der Bundesärztekammer vorgeschrieben zwischen 18 und 68 Jahren [38]. Im Durchschnitt waren die Spender dieser Arbeit, laut Angaben beteiligter Institute für Transfusionsmedizin, $39,9 \pm 14,3$ Jahre, ausschließlich bezogen auf Neuspender $27,4 \pm 10,6$ Jahre alt. Zur Charakterisierung von Blutspendern beschrieben Atsma et al. verschiedene soziodemographische Eigenschaften bei 15.000 untersuchten Niederländern [18]. Das Durchschnittsalter betrug 46,3 Jahre. Nahezu gleich häufig spendeten Männer und Frauen. Übereinstimmend waren in verschiedenen Studien Männer anteilig zwischen 47,3% bis 56,3% vertreten [18, 188, 189]. Es ist also anzunehmen, dass auch in dieser hier untersuchten Kohorte Männer und Frauen etwa gleich häufig vertreten waren. Die Lebensweise von Blutspendern erschien zudem gesünder als von Nicht-Spendern, da sie weniger rauchten (bekannter Risikofaktor für die Manifestation von Autoimmunkrankheiten), seltener exzessiv Alkohol tranken, aber häufiger Sport trieben [18]. Die hier untersuchte Blutspenderpopulation zeigte ein deutlich jüngeres Durchschnittsalter verglichen mit der Studie von Atsma et al.. Dies ließe sich womöglich dadurch erklären, dass das Institut für Transfusionsmedizin in Lübeck und Kiel als Aufwandsentschädigung einen Geldwert von aktuell 20 Euro pro Spende bezahle und so vor allem junge Studenten, Auszubildende oder Menschen, die ein finanzielles Zubrot erlangen möchten, ansprache. Veldhuizen et al. konnten zeigen, dass das Blutspendeverhalten vom Alter abhängt. Während die 18 bis 45 Jährigen häufig nur einmalig oder gelegentlich Blut spenden, überwiegen bei den über 45 Jährigen die regelmäßigen Vielfachspender [188]. Auch in der hier vorliegenden Untersuchung waren Neuspender durchschnittlich deutlich jünger als alle Spender insgesamt. Somit ist anzunehmen, dass in der getesteten Gesamtpopulation ein großer Anteil jüngerer Neuspender enthalten ist.

4.2 Pemphigus- und Pemphigoid assoziierte Autoantikörper sind niedrigprävalent in Gesunden nachweisbar

Diese Arbeit dokumentiert eine insgesamt niedrige Prävalenz von Pemphigus- und Pemphigoid assoziierten Autoantikörpern in Gesunden. Zusammengenommen waren diese in fast 1% der untersuchten 7.063 Blutspender nachweisbar. Damit umfasst diese Studie die mit Abstand größte Population von Gesunden, welche bisher auf die Häufigkeit von Autoantikörpern gegen desmosomale und hemidesmosomale Hautstrukturproteine untersucht wurde. Insgesamt zeigten 0,3% der Gesunden Anti-Dsg1/3 und 0,6% Anti-BP180/230 IgG-Autoantikörper in der indirekten Immunfluoreszenz. Passend zu epidemiologischen Daten, die das Bullöse Pemphigoid als häufigste blasenbildende Autoimmundermatose in Europa aufzeigten [30, 48, 92, 209], wurden BP-assoziierte Autoantikörper öfter nachgewiesen als Pemphigus-assoziierte.

4.2.1 Unterschiede zwischen Indirekter Immunfluoreszenz und ELISA

Es ist hervorzuheben, dass auf den IIF Biochips die immundominante Domäne des jeweiligen Zielantigens rekombinant dargeboten wurden. So exprimierten die transfizierten HEK293-Zellen im Falle von Dsg1 und Dsg3 jeweils die extrazellulären Domänen EC1-EC5 und in Bezug auf BP230 die globuläre C-terminale Domäne. Ferner war die zuvor in Bakterien (*E. coli*) exprimierte nicht-kollagenöse 16. extrazelluläre Domäne des BP180 als Tetramer aufgetragen. Folglich konnten Autoantikörper gegen nicht dargebotene Epitope der Antigene nicht ermittelt werden. Interessanterweise sind jedoch z.B. Antikörper gegen intrazelluläre Bestandteile des BP180 charakteristisch für die frühe Krankheitsphase des BP [54, 83]. Bei vollständiger Darbietung der Zielproteine wären mutmaßlich noch häufiger Autoantikörper gegen die getesteten Hautstrukturproteine in Gesunden nachweisbar gewesen.

Alle in der IIF positiv getesteten Proben sowie eine vergleichbare Anzahl an IIF Negativen wurden anschließend zur Evaluation der Ergebnisse mittels antigenspezifischen ELISA untersucht. Die verwendeten ELISA basierten auf den identischen Antigendomänen wie die IIF. Dabei zeigten 35 von 37 der Anti-BP180-NC16A, 2 von 3 der Anti-BP230, 7 von 15 der Anti-Dsg1 und 6 von 7 der Anti-Dsg3 IIF positiven Proben auch eine korrespondierende positive ELISA Reaktion. Dabei waren Messwerte von minimal 1 bis maximal 200 RE/ml nachweisbar.

Ganz bewusst wurde bei der Bewertung der ELISA Messergebnisse nicht der für die Diagnostik der AIBD empfohlene Schwellenwert von 20 RE/ml als Kriterium berücksichtigt. Dieser Cut-off gilt als Wert, welcher den bestmöglichen Kompromiss aus hoher Sensitivität und gleichzeitig hoher Spezifität zur Diagnosestellung darstellt. Das Ziel

dieser hier durchgeführten Studie liegt jedoch im Nachweis auch niedrigkonzentrierter Autoantikörper gegen Hautstrukturproteine in Gesunden und nicht in der Krankheitsdiagnostik. Zur Antikörperbestimmung ohne klinisches Diagnoseziel ist eine hohe Sensitivität erforderlich, die Spezifität vernachlässigbar. Die vom Hersteller angegebenen Sensitivitäten liegen für die ELISAs zum Nachweis von Dsg1 bei 100%, von Dsg 3 bei 96% [154] und von BP180 bei 90% [167]. Lediglich der Anti-BP230-ELISA hat mit 56% eine deutlich niedrigere Sensitivität, wobei auch Patienten mit BP nur in 60 - 70% Anti-BP230 Antikörper aufweisen [160]. Folglich wurde jegliche nachweisbare Enzymaktivität als positiv gewertet. Die untere Nachweisgrenze der vier verwendeten ELISAs beträgt laut Herstellerangaben 0,3 bis 1 RE/ml (weitere Testcharakteristika siehe Tabelle 2.1: Testcharakteristika der verschiedenen ELISA-Testsysteme.). Da der niedrigste Kalibrator 2 RE/ml entsprach, war die Software, die gemessene Extinktionswerte in relative Enzymaktivitäten umrechnete, nur in der Lage, Messwerte ≥ 1 RE/ml zu kalkulieren. Somit gelten alle Enzymaktivitäten ≥ 1 RE/ml als positiv. Es ist zu beachten, dass sich die Enzymaktivitäten im niedrigen Messbereich nicht linear verhalten. Bei guten Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten (1,2 - 5,9% bzw. 2,6 - 6,8%) sind sie aber als reproduzierbar anzunehmen.

Auffällig hoch lagen die Messwerte der Anti-BP180-NC16A IIF Positiven, von denen die knappe Hälfte Messwerte über 20 RE/ml und genau ein Viertel über 60 RE/ml aufwies. Zwar korreliert bekanntlich der Antikörperspiegel mit der Schwere der klinischen Symptomatik [58, 157], dennoch kann, wie hier gezeigt, eine deutliche Überschreitung des diagnostischen Schwellenwerts ohne Krankheitssymptome einhergehen. Bei solch quantitativ hohen Enzymaktivitäten und zweifach positiver Testung mit unterschiedlichen Methoden (IIF und ELISA) scheinen unspezifische Reaktionen als Ursache unwahrscheinlich. Folglich ist der alleinige Nachweis von Autoantikörpern selbst gegen die pathogenetisch relevante NC16A Domäne [72, 208], nicht aber der BP Erkrankung gleich zu setzen. Weitere Einflussfaktoren zur Manifestation der Krankheit sind notwendig (siehe Kapitel 4.2.2). Als Konsequenz hieraus lässt sich ein umsichtiger Umgang mit Autoantikörpertests ableiten, der zur Minimierung falschpositiver Testergebnisse nur Personen mit typischen Krankheitssymptomen vorbehalten sein sollte.

Während fast alle Anti-BP180, Anti-BP230 und Anti-Dsg3 IIF Positive reproduzierbar auch im ELISA nachweisbare Antikörperaktivitäten hatten, reagierte nur die knappe Hälfte der Anti-Dsg1 IIF Positiven. Mögliche Erklärungsansätze sind: 1. Die Anti-Dsg1 Fluoreszenzmuster wurden falsch positiv interpretiert. 2. Die IIF wies häufiger als das ELISA unspezifische Reaktionen auf; dies entspräche einer niedrigeren Spezifität der IIF im Vergleich zum ELISA. 3. Die deutlich höhere Verdünnung der Plasmaproben (1:101 im

ELISA versus 1:10 in der IIF) verhinderte den quantitativen Nachweis sehr niedrigkonzentrierter Anti-Dsg1 im ELISA. 4. Die IIF hat im Vergleich zum ELISA eine höhere Sensitivität. Schmidt et al. untersuchten die Testeigenschaften des hier verwendeten Anti-Dsg1 ELISA [154]. Dabei fanden sie in 3 von 401 (0,7%) der gesunden Kontrollen positive ELISA Reaktionen. Die hier durchgeführte Studie fand deutlich seltener Anti-Dsg1 positive Individuen. Nur 0,2% der gesunden Blutspender reagierten in der IIF, 0,1% im ELISA. Einerseits stützt dies die höhere Sensitivität der IIF. Andererseits ist es möglich, dass durch die Vorauswahl der Anti-Dsg1 positiven Proben mittels IIF unspezifischen ELISA Reaktionen vorgebeugt wurde.

Insgesamt betrachtet, hatten Anti-BP180-NC16A, Anti-Dsg1 als auch Anti-Dsg3 IIF positive Proben hochsignifikant ($p < 0,001$) höhere ELISA Messwerte als IIF negative Proben. Gleiches galt auch für Anti-BP230 ($p < 0,05$), wobei die statistische Signifikanz aufgrund der geringen Fallzahl niedriger ausfiel. Während im Anti-Dsg1 und Anti-BP230 ELISA keiner der IIF Negativen reagierte, zeigten einzelne IIF Negative gegenüber BP180-NC16A und Dsg3 nachweisbare niedrige Enzymaktivitäten. Dies wirft die Frage nach unspezifischen Reaktionen auf. Vielleicht handelt sich auch um niedrigaffine Antikörper, die nur im ELISA nachweisbar sind. Eine Wiederholung der Versuche würde Fehler in der Testdurchführung ausschließen.

4.2.2 Progredienz zur Krankheitsmanifestation

Insgesamt finden sich Anti-BP180/230 und Anti-Dsg1/3 positive Gesunde deutlich häufiger als Kranke (siehe Kapitel 3.2.1). Verglichen mit der in Dänemark ermittelten Prävalenz von Pemphigus (0,004%) und BP (0,016%) [59], liegt die Häufigkeit der assoziierten Autoantikörper hier 75- bzw. 37-mal höher. Ähnlich wie für andere Autoimmunerkrankungen bekannt [1, 17, 61, 142], könnten auch im Falle von Bullösen Autoimmundermatosen Autoantikörper Jahre vor Krankheitsbeginn nachweisbar sein. Somit würde jeder 75. Gesunde mit Autoantikörpernachweis für Dsg1/3 später an Pemphigus erkranken, jeder 37. Anti-BP180-NC16A positive Spender BP entwickeln. Dieser Prozess könnte mit der Produktion von pathogen relevanten desmo- und hemidesmosomalen Autoantikörpern beginnen. In wenigen Individuen kämen durch endo- und/oder exogene krankheitsbegünstigende Faktoren hinzu, welche letztlich zur Manifestation der Erkrankung führen. Zur Differenzierung „gefährdeter“ und „resistenter“ Personen wäre die Kenntnis weiterer Biomarker notwendig. Für solch seltene Erkrankungen wie Pemphigus und BP wäre es allerdings erforderlich, eine sehr große Population in einer Längsschnittstudie prospektiv zu beobachten, um Einflussfaktoren bestimmen zu können. Sollte solch eine Untersuchung am Ende 50 bis 100 Patienten umfassen, so wäre bei einer kombinierten jährlichen Inzidenz aller AIBD von 0,005% eine

prospektive Beobachtung von 1 - 2 Millionen Menschen für 1 Jahr oder 200.000 - 400.000 Individuen für 5 Jahre dafür notwendig.

4.2.3 Mutmaßliche Unterschätzung der Prävalenz durch hohes Erkrankungsalter

Wie bereits erwähnt, ist auf Grundlage der Literaturangaben eine nahezu Gleichverteilung von Männern und Frauen innerhalb dieser Kohorte anzunehmen, wodurch eine Beeinflussung der ermittelten Antikörperprävalenz durch das Geschlecht unwahrscheinlich erscheint. Aufgrund des mutmaßlich großen Anteils junger Blutspender sowie des Ausschlusses von Kindern und Alten (über 68 Jahren) ist aber eine Unterschätzung der Häufigkeit der Autoantikörper gegen Hautstrukturproteine nicht sicher auszuschließen.

So wäre eine noch höhere Prävalenz der BP-assoziierten Autoantikörper für das fortgeschrittene Lebensalter in Gesunden zu erwarten, da der Krankheitsgipfel knapp vor dem 80. Lebensalter liegt und das Erkrankungsrisiko jenseits des 60. Lebensjahrs stark ansteigt [76, 95, 162]. Den zuvor aufgeführten Gedanken folgend wäre dieser Gipfel flankiert durch eine große Anzahl Gesunder mit Autoantikörpern, die jedoch nie erkranken. Zwar liegt das Erkrankungsalter mit 40 bis 60 Jahren für Pemphigus deutlich niedriger als für BP [123], bisher ist jedoch der Einfluss des Alters in Gesunden auch auf die Anti-Dsg1/3 Antikörper unbekannt. Zukünftige Studien der Anti-BP180/230 und Anti-Dsg1/3 Antikörper in alten Menschen ohne Hauterkrankung wären hilfreich, um diesen Effekt zu untersuchen.

4.2.4 Vergleich zu bisher publizierten Häufigkeiten

Die hier vorliegenden Daten lösen die Diskrepanz der bisher publizierten Häufigkeiten von Pemphigus- und Pemphigoid assoziierten Antikörpern in Gesunden. In Tabelle 4.1 sind bisher veröffentlichte Angaben zusammengetragen. Anders als in dieser Arbeit wurden jene fast ausschließlich in Vergleichskohorten bei der Prüfung neuer ELISA-Testverfahren ermittelt. Dabei fanden sich Anti-Dsg1 Antikörper in 0,0 - 0,7%, Anti-Dsg3 in 0,0 - 0,2%, Anti-BP180 in 0,0 - 2,0% und mit größter Spannweite Anti-BP230 in 0,0 - 7,0% der gesunden Probanden (Tabelle 4.1). Die hier bestimmten Häufigkeiten liegen sowohl für Pemphigus- als auch Pemphigoid assoziierte Antikörper verglichen mit jenen Studien im niedrigen Prävalenzbereich.

Die Unterschiede der zuvor publizierten Studien können durch Varianz des ethnischen Hintergrunds und Art des verwendeten Antigens erklärt werden. Solch eindrucksvolle ethnische Abhängigkeit konnte beispielsweise für ANA in Gesunden gezeigt werden. In Italien wiesen 23% der immigrierten Filipinos ANA auf, aber nur 8% der Einheimischen

[40]. Die in Tabelle 4.1 aufgelisteten ELISAs gegen Hautstrukturproteine wurden in Europa oder Asien durchgeführt und basierten auf rekombinant exprimierten Proteinfragmenten, welche die immunrelevanten Domänen enthielten aus bakteriellen (z.B. E. coli), insektiziden (z.B. Baculovirustransfer in Insektenzellen) oder auch humanen Zellreihen (z.B. HEK293).

Eine Ausnahme bildet die Arbeit von Desai et al., welche mittels Immunoblotting auffällig hochprävalent Antikörper gegen aus humaner Haut extrahiertes BP180 in 57% und BP230 in 9% der 61 Gesunden nachwies [53]. Nachfolgend führten sie auch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie und Anti-BP180-NC16A ELISA durch. Nur 5% aller Probanden zeigten in der IIF lineare IgG-Ablagerungen und alle reagierten negativ im Anti-BP180-NC16A ELISA. Das im Immunoblot verwendete native BP180 bietet im Gegensatz zum NC16A ELISA alle Epitope des Antigens. Folglich müssen die im Immunoblot nachgewiesenen Anti-BP180 Autoantikörper außerhalb der immundominanten NC16A Domäne [72, 208] gebunden haben und trugen möglicherweise keinerlei Pathogenität in sich.

Tabelle 4.1: Publierte Prävalenzen Pemphigus- und Pemphigoid assoziierter Antikörper.

Autoantikörper gegen	Untersuchte Population: Bezeichnung und Größe (N)	Autoantikörper Prävalenz [%]	Methodik	Zitat
Dsg1	Kontrollkohorte (53)	0,0	ELISA	[87]
	Blutspender (401)	0,7	ELISA	[154]
Dsg3	Kontrollkohorte (53)	0,0	ELISA	[87]
	Blutspender (401)	0,2	ELISA	[154]
BP180	Gesunde Freiwillige (47)	0,0	ELISA	[207]
	Blutspender (494)	2,0	ELISA	[167]
	Kontrollkohorte (336)	1,5	ELISA	[98]
	Kontrollkohorte (61) (20)	57,0 0,0	Immunoblot ELISA	[53]
BP230	Kontrollkohorte (109)	0,0	ELISA	[202]
	Kontrollkohorte (56)	7,0	ELISA	[101]
	Blutspender (483)	2,1	ELISA	[34]
	Kontrollkohorte (61)	9,0	Immunoblot	[53]

4.2.5 Pathogenität der Pemphigus- und Pemphigoid-Antikörper

Weiterführende Analysen zur Bestimmung der Pathogenität der in Gesunden nachgewiesenen Autoantikörper gegen Hautstrukturproteine konnten aufgrund des zu großen Zeitumfangs nicht mehr im Rahmen dieser hier vorliegenden Studie durchgeführt werden. Insgesamt gestaltet sich die Funktionalitätsprüfung für solch seltene Autoantikörper schwierig, da trotz großer Kohorte nur wenige Gesunde Antikörper gegen BP180, noch seltener Dsg1, Dsg3 und BP230 tragen und untersucht werden könnten. Allgemein betrachtet, hängt das pathogene Potential eines Autoantikörpers von mehreren Faktoren ab. Neben der Plasmakonzentration sind hier beispielsweise Antikörperklasse bzw. -subklasse, Epitopspezifität oder Avidität zu nennen. Dieser Arbeit nachfolgend nutzte Hiroshi Koga, Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Kutane Autoimmunität, Klinik für Dermatologie, Universität zu Lübeck, einige BP180-NC16A sowie Dsg3 positive Proben dieser Kohorte für in vitro Untersuchungen des pathogenen Potentials jener Autoantikörper.

4.2.5.1 Plasmakonzentration

Die Pathogenität der BP assoziierten Autoantikörper kann in vitro experimentell mithilfe der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nach Bindung von Neutrophilen an Immunkomplexe abgeschätzt werden. So ist bekannt, dass polymorphkernige Leukozyten (PMN) gesunder Spender nach Kontakt mit im Plasma von BP Patienten enthaltenen als auch mit rekombinant erzeugten NC16A-Immunkomplexen signifikant messbar ROS freisetzen [204]. Interessanterweise konnte Hiroshi Koga eine Korrelation zwischen Konzentration der Anti-BP180-NC16A Antikörper und Ausmaß der ROS Freisetzung nachweisen (persönliche Mitteilung Dr. Hiroshi Koga). Während Anti-NC16-A Negative und Anti-NC16-A Positive < 20 RE/ml die PMN nicht aktivierten, waren Anti-NC16A Positive > 20 RE/ml ebenso wie die zum Vergleich mitgeführten Proben von BP Patienten in der Lage, PMN zu aktivieren und ROS auszuschütten. Diese Erkenntnisse belegen das vorhandene pathogene Potential der in Gesunden nachgewiesenen Anti-BP180-NC16A Autoantikörper in Abhängigkeit von ihrer Plasmakonzentration.

Für die Bestimmung der Pathogenität der Anti-Dsg3 Antikörper nutzte Hiroshi Koga ein Keratinozytenassay, welches die pathogenetisch relevante Internalisation der Dsg3 Moleküle von der Zelloberfläche [194] nach Bindung der Antikörper testet. Hierfür wurden HaCaT Zellen mit 15 mg/ml aufgereinigtem IgG von einem Pemphiguspatienten, drei Anti-Dsg3 positiven und einem Anti-Dsg3 negativen Blutspendern inkubiert und anschließend die Position von Dsg3 durch Fluoreszenzmarkierung sichtbar gemacht. Im Gegensatz zum Patientenserum war für keine der Anti-Dsg3 positiven Proben eine Internalisation von Dsg3 nachweisbar. Mutmaßlich lässt sich dies durch die zu niedrigen

Plasmakonzentrationen der Anti-Dsg3 Autoantikörper, welche im ELISA zwischen 4-10 RE/ml lagen, oder apathogene Epitopspezifitäten (siehe Kapitel 4.2.5.3) in den positiv getesteten Gesunden begründen.

4.2.5.2 Antikörperklassen und -subklassen

Im Rahmen dieser hier durchgeführten Studie wurden durch selektive Anti-IgG Markierung mittels IIF und ELISA ausschließlich im Plasma zirkulierende IgG-Autoantikörper gegen hemidesmosomale und desmosomale Strukturproteine bestimmt. Es ist zu bedenken, dass die Effektorfunktion und Verteilung der Autoantikörper im Organismus in Abhängigkeit ihres Isotyps, welcher durch die konstante Region der schweren Kette (Fc - $\delta, \mu, \alpha, \gamma, \epsilon$) bedingt wird, differiert [125, 193]. Zunächst exprimieren reife, naive B-Zellen antigenspezifisch lediglich IgD und IgM auf ihrer Oberfläche; einige wenige Plasmazellen sekretieren jene Isotypen. Im Rahmen der Immunantwort kann jedoch nach Antigenkontakt und B-Zell-Aktivierung durch Rekombination der DNA ein Klassenwechsel durchlaufen werden [125]. Folglich finden sich von Plasmazellen produzierte IgG, IgA oder IgE Antikörper erst später in der Immunantwort und sprächen im Falle von Autoantikörpern für ein Versagen der körpereigenen Toleranzstrategien. Hier sei kurz auf das dieser Theorie widersprechende Phänomen der natürlichen IgG Autoantikörper hingewiesen, welches näher in Kapitel 4.3.2 diskutiert wird.

Da vor IgG zunächst IgM Antikörper gebildet werden, wäre es plausibel, dass die Prävalenzen spezifischer Anti-BP180/BP230 bzw. Anti-Dsg1/3 für IgM im Vergleich zu den hier nachgewiesenen IgG Antikörpern in Gesunden noch höher liegen. Eine Bestimmung dieser spezifischen IgM Antikörper in gesunden Probanden wäre zukünftig lohnenswert, da sie leider im Rahmen dieser Studie aufgrund des zu großen zeitlichen und finanziellen Umfangs nicht verwirklicht werden konnte.

In BP Patienten sind Anti-BP180-NC16A Autoantikörper verschiedener Klassen nachgewiesen wurden. Dazu zählen neben IgG mit Prädominanz für IgG4 und IgG1 auch spezifische IgA und IgE Immunglobuline [58, 89, 100]. Klinisch leiden Patienten mit Anti-BP180-NC16A IgE Antikörpern unter schweren, meist kortikoidrefraktären Verläufen [58, 89]. Um festzustellen, ob sich die IgG-Subklasse der Anti-BP180 positiven Gesunden von Erkrankten unterscheidet, führte Hiroshi Koga einen modifizierten ELISA mit zehn Anti-BP180-NC16A positiven Blutspendern dieser hier untersuchten Kohorte und zehn BP Patienten durch. Hierbei zeigten sich im Gegensatz zur publizierten Prädominanz für IgG4 [58] sowohl bei Gesunden als auch BP Patienten vorrangig spezifische Anti-BP180-IgG3 Autoantikörper (persönliche Mitteilung Dr. Hiroshi Koga). Jene Subklasse, welche stark Komplement aktiviert und besonders affin an Fc γ -Rezeptoren zur Antigenopsonisierung

bindet [125, 193]. Vielleicht wies der benutzte Test im Allgemeinen eine höhere Sensitivität zum Nachweis von IgG3 als IgG4 Antikörpern auf.

Ähnlich wie bei BP finden sich auch bei Pemphigus foliaceus und vulgaris neben IgA und IgE mehrheitlich IgG4 Anti-Dsg1/3 Autoantikörper [32, 70, 173]. Zudem ist in der Pathogenese des endemischen Pemphigus foliaceus ein Wandel der spezifischen Anti-Dsg1-IgG1 zu IgG4 beobachtet wurden [145]. Aufgrund zu geringer Restplasmavolumina und insgesamt niedriger ELISA Messwerten (mehrheitlich 5-15 RE/ml, max. 103 RE/ml) stand Hiroshi Koga leider nicht genügend Material zur Verfügung, um eine IgG-Subklassenanalyse für Anti-Dsg-1/3 Positive durchzuführen. Bemerkenswerterweise ist nur für IgG4 die Möglichkeit der bivalenten Hybridantikörperbildung bekannt [143]. Dabei kann nach Spaltung der dimerisierten schweren Kette des IgG4 eine Leicht- und Schwere Kette mit einer anderen Paarung reassoziieren, sodass zwei verschiedene Antigenspezifitäten erkannt werden. Die Bedeutung dieser Eigenschaft für die Pathophysiologie der blasenbildenden Autoimmundermatosen ist bislang unklar.

4.2.5.3 Epitope

Die Anti-BP180 Autoantikörper von BP Patienten reagieren nachweislich mit verschiedenen Epitopen des transmembranösen Proteins [55, 83, 135]. Die Epitopspezifitäten können sich im Krankheitsverlauf ändern [54], auch epitope spreading genannt, wobei typischerweise eine Anhäufung innerhalb der pathogenetisch relevanten extrazellulären nicht-kollagenösen NC16A2-3 Region auffällt [111, 208]. Hingegen sind Anti-C-terminale Antikörper mit Schleimhautbeteiligung assoziiert; Antikörper gegen intrazelluläre Bestandteile finden sich wie oben erwähnt vor allem bei Krankheitsbeginn [54, 83].

Hiroshi Koga testete mittels fine epitope mapping die Anti-BP180-NC16A-IgG Reaktivität gegenüber NC16A2-3 vergleichend bei jeweils zehn Autoantikörper positiven Gesunden dieser Kohorte mit ELISA Messwerten > 20 RE/ml und < 20 RE/ml sowie zehn BP Patienten. Im Gegensatz zu den BP Patienten, welche mehrheitlich mit Epitopen innerhalb NC16A2-3 reagierten, erkannten lediglich 1/10 Proben (> 20 RE/ml) bzw. 2/10 Proben (< 20 RE/ml) von Gesunden jene Epitope (persönliche Mitteilung Dr. Hiroshi Koga). Dies könnte die fehlende Pathologie und klinische Manifestation erklären. Hier liesse sich wiederum spekulieren, ob Gesunde mit Anti-BP180 Autoantikörpern zukünftig an BP erkranken könnten (siehe Kapitel 4.2.2). Mutmaßlich würden sich passend zu den Beobachtungen am Krankheitsbeginn auch in einer präklinischen Phase vorwiegend gegen intrazelluläre Epitope gerichtete Antikörper finden lassen. Vielleicht unterschieden sich die Epitopspezifitäten jedoch auch grundsätzlich zwischen Patienten und Gesunden.

Eine genaue Bestimmung der Zielepitope von Anti-BP180 positiven Gesunden wäre technisch aufwändig, aber aufschlussreich.

Übertragbare Betrachtungen gelten auch für die in Gesunden gefundenen Anti-Dsg1/3 Autoantikörper. In Pemphiguspatienten nachgewiesene pathogen bedeutsame Anti-Dsg1 und Anti-Dsg3 Autoantikörper binden mehrheitlich an Epitope innerhalb der ersten extrazellulären Domäne (EC1) des N-terminalen Endes [43, 115, 164]. Zusätzlich sind andere Angriffspunkte der Anti-Dsg-Antikörper bekannt. Interessanterweise konnte für den endemischen Pemphigus sogar ein Epitopwandel von Ektodomäne EC5 auf EC1 vor Krankheitsausbruch beobachtet werden [109]. Es wäre somit denkbar, dass die hier nachgewiesenen Anti-Dsg-Antikörper nicht an die pathogene Domäne EC1, sondern andernorts binden. Hierzu wäre eine Untersuchung der Epitopspezifität hilfreich, um mögliche Unterschiede zwischen Anti-Dsg1/3 Autoantikörpern in Gesunden und Erkrankten charakterisieren zu können.

4.2.5.4 Affinität und Avidität

Da auch Affinität und Avidität die Effektorfunktionen eines Antikörpers bestimmen, wäre es zukünftig auch interessant, diese Eigenschaften in Anti-BP180/230 bzw. Anti-Dsg1/3 positiven Gesunden zu untersuchen. Zudem finden sich im Verlauf einer Immunantwort, bedingt durch die somatische Hypermutation, zunächst niedrig-affine/avide, später hoch-affine/avide spezifische Antikörper [125]. Während Avidität die Stärke der multivalenten Antigen-Antikörper-Bindung umfasst, beschreibt Affinität die Stärke einer einzelnen Epitop-Antikörper-Interaktion [125]. Dabei ist die Avidität vielfach größer als die Affinität (für bivalente Bindungen ca. 100-mal), da Lösung der Antigen-Antikörper-Bindung Energie für das Aufbrechen aller Einzelbindungen gleichzeitig voraussetzt.

Die Affinität der gefundenen Pemphigoid- und Pemphigusautoantikörper wäre erst nach deren chromatografischer Aufreinigung durch Bestimmung der Dissoziationskonstante mittels equilibrium dialysis ermittelbar. Deutlich einfacher hingegen könnte eine grobe Bestimmung der Avidität durch Vorbehandlung einer IIF-Testung mit Harnstoff sein, welcher niedrig-avide Antigen-Antikörper-Bindungen spaltet. Wie vom Hersteller Euroimmun bereits beispielsweise für ihre IIF-Assays zum Nachweis von EBV, VZV, CMV empfohlen [212], könnte dieses Prinzip auch für die Abschätzung der Avidität der Antikörper gegen Hautstrukturproteine genutzt werden.

4.3 Gesunde tragen häufig krankheitsspezifische Autoantikörper

Das erweiterte Screening deckte Autoantikörper gegen TPO in 4,6%, CCP in 1,3%, PCA in 1,1% und ANCA in 0,3% der Gesunden auf. Diese Häufigkeiten stützen Angaben zuvor publizierter Studien, die zumeist in kleinen Kontrollkohorten gesunder Probanden im Rahmen von Untersuchungen an Patienten ermittelt wurden. Diese fanden Anti-TPO in 3,4 - 6% [96, 102], Anti-CCP in 1,1 - 1,8% [140, 142] und Anti-PCA in 1,6 - 7,8% [39, 68] unter gesunden Kindern oder Erwachsenen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Prävalenz von ANCA in Gesunden bestimmt.

Dabei wurden für Anti-CCP Antikörper alle Messwerte ≥ 5 RE/ml als positiv berücksichtigt. Entgegen der zuvor ausgeführten Betrachtungen für Autoantikörper gegen Hautstrukturproteine konnte nicht jede nachweisbare ELISA Reaktion gewertet werden. Der überraschend hohe Anteil von 21% Anti-CCP positiver Blutspender bei ≥ 1 RE/ml mit mehrheitlich maximalen Messwerten von 2 RE/ml lässt an der Glaubwürdigkeit des Ergebnisses zweifeln und häufige unspezifische Reaktionen vermuten. Es ist aber nicht gänzlich auszuschließen, dass die 21% dem wahren Ergebnis entsprechen.

Hierbei handelt es sich im Falle von Anti-CCP und ANCA um Antikörper der Klasse IgG. Für Anti-TPO und Anti-PCA Immunglobuline wurden durch Anti-IgA/M/G Fluoreszenzmarkierung drei verschiedene Antikörperklassen bestimmt. Eine Differenzierung der Klassen wäre in zukünftigen Untersuchungen lohnenswert, um festzustellen, wie viele der Positiven IgM, IgG oder beide Immunglobuline trugen. So ist die Mehrzahl der natürlichen Antikörper vom IgM-Typ; krankheitsrelevanten pathogenen Antikörpern wird die IgG-Klasse zugeschrieben [20, 105, 128]. Nähere Betrachtungen hinsichtlich der Eigenschaften der in dieser Studie gefundenen Autoantikörper finden sich in den nachfolgenden Kapiteln 4.3.1 bis 4.3.3.

Alle Probanden wurden negativ für pankreatische Inselzellantikörper getestet, welche charakteristisch für T1DM sind. Da T1DM mit Ausnahme der late-onset Sonderform im Kinder- und Jugendalter diagnostiziert wird, das Mindestalter der Blutspender hingegen 18 Jahre beträgt und Patienten mit insulinpflichtigem Diabetes vom Blutspenden ausgeschlossen sind [38], trifft dies die Erwartungen. Auch waren keine Antikörper gegen adrenale, ovarielle oder testikuläre Zielantigene nachweisbar. Mit einer Prävalenz von 18/100.000 ist die autoimmun bedingte primäre Nebenniereninsuffizienz [59] von jenen endokrinen Erkrankungen die häufigste. Primärer Hypogonadismus oder primäre Ovarialinsuffizienz werden nur sehr selten durch pathologische Autoimmunphänomene verursacht. Aufgrund der Seltenheit dieser Erkrankungen wäre wahrscheinlich nur durch

umfangreiche Vergrößerung der Kohorte ein Nachweis von Autoantikörpern gegen adrenale, ovarielle oder testikuläre Antigene möglich.

In der Subpopulation der 369 zufällig ausgewählten Blutspender, welche auf alle hier geprüften krankheitsspezifischen Autoantikörper untersucht wurden (BP180/230, Dsg1/3, CCP, ANCA, TPO, PCA, AK anderer Autoimmunendokrinopathien, ANA), reagierte jeder fünfte Gesunde in mindestens einem der durchgeführten Autoantikörpertests positiv. Somit ist die benigne Autoimmunität (Präsenz von Autoantikörpern ohne Krankheitssymptome) längst kein seltenes Phänomen unter Gesunden. Vielmehr ist fraglich, ob die Autoantikörper persistieren und welches Ausmaß an Pathogenität sie in sich tragen. Oder sind es gar natürliche Autoantikörper, die hier nachgewiesen wurden?

4.3.1 Persistenz der Autoantikörper in Gesunden

Basierend auf dem Querschnittsdesign dieser Studie kann lediglich auf die Punktprävalenz der Autoantikörper in Gesunden geschlossen werden. Die Persistenz von Autoantikörpern ist seit Bekanntwerden der teils transienten ANA Induktion durch Infektionen wie z.B. Bilharziose, chronische Hepatitis C oder Tuberkulose, umstritten [26, 60, 130]. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden 53 Individuen mit Nachweis von ANA (Titer > 1:640) ohne Hinweis auf eine Kollagenose nach einem Beobachtungszeitraum von fünf bzw. zehn Jahren erneut klinisch und laborchemisch untersucht [126, 197]. Nach fünf Jahren waren 91%, nach zehn Jahren immer noch 78% der Probanden ANA positiv. Fast alle der Getesteten blieben gesund, lediglich fünf Testpersonen waren nach 10 Jahren an einer Kollagenose erkrankt. Diese Studien belegen, dass erhöhte ANA Spiegel über viele Jahre in Gesunden persistieren. In der Literatur finden sich kaum aussagekräftige Studien über die Entwicklung von Autoantikörpertitern gegenüber BP180/230, Dsg1/3, TPO, CCP, PCA oder ANCA in Gesunden. Für Anti-TPO Antikörper ist eine Persistenz in ca. 90% der Fälle über einen Zeitraum von 20 Jahren beschrieben wurden, wobei die jährliche Wahrscheinlichkeit für Anti-TPO positive Individuen an manifestem Hypothyreoidismus zu erkranken bei 2,1% lag [187]. Um auch die Persistenz der anderen hier getesteten Autoantikörper beurteilen zu können, wären aufwendige prospektive Längsschnittstudien von Gesunden mit Testung multipler Autoantikörper notwendig.

4.3.2 Natürliche Autoantikörper

Aufgrund des epidemiologischen Konzepts dieser hier durchgeführten Studie ist es nicht möglich, Aussagen über die Funktionalität der gefundenen Antikörper zu treffen. Somit wäre es prinzipiell denkbar, dass die gefundenen Autoantikörper sogar natürlichen Autoantikörpern entsprechen.

Basierend auf der klonalen Selektionstheorie von Burnet [117] werden Autoantikörper im Allgemeinen als verbotene, falsche Klone resultierend aus dem Verlust der Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen verstanden. Demzufolge gilt ihre Präsenz als unphysiologisch und krankhaft. Im Sinne der Immunhomöostase hätten sie während der Ontogenese entfernt werden müssen. Dieser Theorie widersprechend werden seit mehr als vier Jahrzehnten aber auch das Vorkommen und die Bedeutung natürlicher Autoantikörper erforscht.

Natürliche Antikörper werden ohne jegliche vorherige Immunisierung im Serum Gesunder gefunden. Experimentell konnte gezeigt werden, dass natürliche IgM Antikörper auch im Serum von komplett antigen- und keimfrei gehaltenen Mäusen präsent sind und ihr Repertoire jenem von Mäusen mit Antigen- und Keimkontakt gleicht [80]. Im Menschen sind natürliche Antikörper in großer Anzahl mit der Geburt nachweisbar [118, 122]. Interessanterweise reagiert ein Großteil der natürlichen Antikörper mono- oder polyspezifisch mit einer oder mehreren körpereigenen Strukturen. Jene Immunglobuline werden deshalb natürliche Autoantikörper genannt [20, 105, 128]. Auch hier können IgM, IgG und IgA Isotypen unterschieden werden, welche eine breite Affinität (10^{-5} bis 10^{-8} M) und Polyreaktivität aufweisen [105].

Natürliche Autoantikörper sind ubiquitär präsent und richten sich gegen hochkonservierte körpereigene Antigene wie beispielsweise Albumin, Zytokine, Immunglobuline, Kollagen, intrazelluläre Komponenten (z.B. Aktin, Myosin, dsDNA), Hormone (z.B. Thyreoglobulin, Insulin) und vieles mehr [20, 122]. Damit reagieren sie unter anderem mit denselben Autoantigenen, wie die in Kranken gefundenen pathologischen Autoantikörper. Während natürliche Autoantikörper von nahezu unveränderten Keimbahngenen kodiert werden, ohne die somatische Hypermutation durchlaufen zu haben [20, 105], sind in Kranken gefundene Autoantikörper jedoch somatisch hypermutiert. Nagele et al. demonstrierten mithilfe eines Microarrays, der fast 10.000 verschiedene körpereigene Proteine umfasste, dass jedes getestete Individuum mindestens 300, im Mittel tausende verschiedene natürliche IgG Autoantikörper besitzt ($n=166$, 1.997 ± 1.052) [128]. Dies ist insofern bemerkenswert, da IgG Antikörper Zeichen einer nach Antigenkontakt aktivierten Immunantwort sind und folglich für einen Toleranzverlust gegen das Selbst sprechen

würden (siehe Kapitel 4.2.5.2). Zuvor waren natürliche Antikörper vor allem der IgM-Klasse zugeordnet worden.

Die Vielzahl und Ubiquität der natürlichen Autoantikörper lässt physiologisch bedeutsame Funktionen nahe liegen [21]. Natürliche Autoantikörper unterstützen die Gewebemöostase, indem sie an alterierte Zellmembranen apoptotischer Zellen binden und deren Abbau einleiten [21, 75, 105]. Dabei soll diese Antigenmarkierung zur Internalisierung und Prozessierung durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) beitragen und damit die Präsentation für T-Zellen unterstützen [179]. Bedingt durch ihre ausgeprägte Poly- oder Kreuzreaktivität binden sie auch an Epitope von Pathogenen, welche dem Selbst ähnlich erscheinen und dienen damit der schnellen, „unspezifischen“ Erregerabwehr [105]. Anti-inflammatorische Zytokinmodulation, Beeinflussung von B- und T-Zellen sowie Anti-idiotypische Interaktionen natürlicher Autoantikörper dienen der Immunregulation [21]. Durch die Bindung und konsekutive Blockade von Idiotypen, den Epitop-spezifischen variablen Regionen der Immungobuline und T-Zell-Rezeptoren (TCR), können sie überschießende Immunreaktionen unterdrücken. Ferner sind beispielsweise Anti-IgG Fc spezifische natürliche Autoantikörper in der Lage, zur Clearance zirkulierender Immunkomplexe beizutragen [105]. Sogar ihre Bedeutung in der Prävention pathogener Autoimmunität, also von Autoimmunkrankheiten, wird diskutiert. Im Gegensatz dazu versteht die klonale Selektionstheorie von Burnet Autoantikörper als verbotene falsche Klone, welche durch Versagen zentraler und peripherer Toleranzstrategien entstehen und negiert ihre physiologische Bedeutung [117].

Dennoch sollte in der klinischen Praxis bedacht werden, dass möglicherweise mit den Standardverfahren wie IIF oder ELISA aufgrund identischer Zielantigene auch natürliche Autoantikörper bestimmt werden. Beispielhaft hierfür wäre dsDNA zu nennen, welche sowohl als Zielstruktur natürlicher wie auch pathogener krankheitsspezifischer SLE Autoantikörper berichtet wurde [20, 122]. Folglich sollten spezifische Autoantikörpertests gezielt bei Patienten mit krankheitstypischen Symptomen und nicht leichtfertig als Screening eingesetzt werden. Durch Minimierung der falschpositiven Testergebnisse würde folglich ein größerer klinischer Aussagewert und Nutzen bestehen.

4.3.3 Glykosylierung von Autoantikörpern

Als ein möglicher Faktor, der die Pathogenität von Autoantikörper beeinflussen kann, wurde in den letzten Jahren die Glykosylierung der Immunglobuline identifiziert. Die Glykosylierung zählt zu den wichtigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen, und läuft zumeist im rauen endoplasmatischen Retikulum ab. Auch an Immunglobuline werden verschiedene Saccharide und Aminosucker sowohl im Fab- als auch im Fc-Fragment enzymatisch angebaut und beeinflussen deren dreidimensionale Struktur und

biologische Aktivität [125, 146]. Das Fc-Fragment der Antikörper wird dabei an der konservierten Position Asparagin 297 der schweren Kette durch N-Acetyl-Glucosamine, Fucose, Mannose, Galaktose und Sialinsäure modifiziert. In Abhängigkeit ihres Glykosylierungsmusters sind für IgG Antikörper pro- und anti-entzündliche Eigenschaften beschrieben wurden. Je mehr nicht-galaktosylierte IgG Autoantikörper im Serum von Patienten mit SLE und RA gefunden wurden, desto höher lag die Krankheitsaktivität [46]. Ebenso konnte durch anti-TNF α Therapie eine Steigerung der galaktosylierten und sialylierten IgGs erreicht werden, welches zur Verbesserung der RA Symptome führte [46, 185]. Mechanistisch erklärt sich dies durch Beeinflussung der Rezeptorbindung; während nicht-galaktosylierte IgG-Fc Fragmente mit proinflammatorischen Fc γ -Rezeptoren wie Fc γ I oder Fc γ III interagieren, binden galaktosylierte IgGs an den inhibitorischen Fc γ IIb Rezeptor [46]. Zudem vermitteln Sialinsäuren Fc γ IIb Rezeptor unabhängig über den Lectinrezeptor DC-SIGN immunsuppressive Funktionen [46].

Kürzlich gelang es Rombouts et al. in einer prospektiven Studie von knapp 200 Probanden mit arthralgischen Beschwerden und Serumnachweis von Anti-CCP Antikörpern die Änderung der Galaktosylierung vor Diagnose der Rheumatoiden Arthritis zu beweisen [146]. Dabei verringerte sich der Anteil der galaktosylierten Anti-CCP-IgG1 Autoantikörper signifikant im Mittel drei Monate vor Diagnosestellung und verlief parallel zur Beschleunigung der Blutsenkungsgeschwindigkeit als Surrogatmarker der systemischen Entzündungsreaktion. Diese Parallelität lässt jedoch keine Schlussfolgerung zu, ob die Hypogalaktosylierung Ursache oder Folge der Inflammation ist. Bei all jenen Probanden, welche die Diagnosekriterien einer RA nicht erfüllten, war keine Änderung der Galaktosylierung der Anti-CCP-IgG1 Antikörper über die Beobachtungszeit nachweisbar. Einflüsse auf die Glykosylierung werden von der Fachwelt noch umfangreich diskutiert. In vitro konnten sowohl Umwelteinflüsse (z.B. Vitamin A Derivate) sowie Stimulatoren des angeborenen (z.B. TLR-Aktivatoren) und erworbenen (z.B. IL-21) Immunsystems Einfluss auf das Glykosylierungsmuster der Plasmazellen nehmen [191]. Im Allgemeinen geht man heute davon aus, dass unter Präsenz proinflammatorischer Kostimulation eine Suppression der α 2,6-Sialyltransferase in den Plasmazellen folgt und vor allem agalaktosylierte und asialylierte Immunglobuline produziert werden [46].

In Hinblick auf diese Erkenntnisse wäre es lohnenswert, auch das Glykosylierungsmuster der Autoantikörper in Gesunden zu studieren. Leider ist dies in der hier betrachteten Kohorte wenig sinnvoll, da keinerlei Angaben zu Geschlecht und Alter der Blutspender bekannt sind, diese Faktoren die Glykosylierung jedoch beeinflussen [44, 165].

4.3.4 Autoantikörper finden sich häufiger als die Krankheitsprävalenz

Fast alle getesteten Autoantikörper fanden sich bei Gesunden 20- bis 75-mal häufiger als die Prävalenz der assoziierten Erkrankung, welche der Studie von Eaton et al. entnommen wurde [59]. Für die hier berechneten Ratios eignete sich diese Studie aufgrund der Darstellung vielzähliger Autoimmunerkrankungen und der ethnischen Ähnlichkeit zwischen dänischer und deutscher Population besonders gut. Dieser große Unterschied legt nahe, dass nur ein geringer Anteil Autoantikörper positiver Blutspender in Zukunft manifest erkranken würde. Dies zeigt sich auch in den hypothetisch kalkulierten Positiven Prädiktiven Werten (PPW) des Erkrankungsrisikos für die verschiedenen Antikörpertests. Die Anzahl der Erkrankenden wurde aus der epidemiologischen Studie von Eaton et al. berechnet und mit der Anzahl der hier ermittelten Autoantikörper positiven Individuen in Bezug auf die gesamte deutsche Bevölkerung (82 Mio. Einwohner) verglichen (siehe Kapitel 2.63.2.1). Für BP180/230, Dsg1/3, TPO, PCA und ANCA lag der hypothetisch errechnete PPW sehr niedrig bei unter 5%. Als Konsequenz für die Klinik lässt sich hieraus ein zurückhaltender Umgang mit Autoantikörper positiven, aber klinisch gesunden Menschen ableiten. Ein positiver Antikörpertest hat ohne Symptome keine Krankheitsrelevanz. Als Screeninginstrument sind sie ungeeignet.

Andererseits finden sich bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten, wie bereits unter Kapitel 1.1.2 beschrieben, schon Jahre vor Diagnosestellung krankheitsspezifische Autoantikörper im Blut [1, 17, 61, 142]. Nun wäre es natürlich von großem Interesse, vorhersagen zu können, welche Individuen erkranken und welche nicht. Durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) diskutiert die Fachwelt heute für viele Autoimmunkrankheiten spezifische Risikogene [125]. Um aber Gene, welche ursprünglich den Toleranzverlust verantworten, von Genen, welche die Krankheitsmanifestation vorantreiben, unterscheiden zu können, müssten in GWA Studien Kranke mit Autoantikörpern gegen Gesunde mit Autoantikörpern verglichen werden. Theoretisch wären dann in beiden Populationen gefundene Loci für den Toleranzverlust verantwortlich, zusätzlich in Kranken vorkommende für die Krankheitsmanifestation. Weitere langfristige prospektive Studien zur Bestimmung zusätzlicher Biomarker, wie z.B. von Laborparametern oder Genexpressionsanalysen [112] in Autoantikörper tragenden Gesunden wären notwendig, um die Erkrankungswahrscheinlichkeit genauer prognostizieren zu können.

Interessanterweise war die Frequenz der Anti-CCP Antikörper unter Gesunden mit 1,3% aber nur 3- bis 4-mal so häufig wie die Krankheitsprävalenz der seropositiven RA [59]. Jeder dritte bis vierte hier getestete Proband würde in Zukunft erkranken. Der hypothetisch kalkulierte PPW des Erkrankungsrisikos lag verglichen mit den anderen

Autoantikörpern deutlich höher bei 29%. Anti-CCP Autoantikörper sind im Einzelfall bis zu 9 Jahre, in einem Drittel von RA Patienten 1,5 Jahre vor Krankheitsmanifestation (PPW 16%) von Rantapää-Dahlquist et al. im Serum nachgewiesen wurden [142]. Folglich sollten Gesunde mit Anti-CCP Antikörpern aufgrund des hohen Erkrankungsrisikos in regelmäßigen Abständen klinisch auf erste arthritische Symptome untersucht werden.

4.3.5 Einfluss von Alter und Geschlecht auf Autoantikörper in Gesunden

Aufgrund des eher jungen Durchschnittsalters ($39,9 \pm 14,3$ Jahre) in der getesteten Kohorte ist eine Über- oder Unterschätzung der Prävalenz gewisser Autoantikörper möglich. Hingegen kann aufgrund der Literaturangaben über die soziodemographischen Eigenschaften von Blutspender [18, 188, 189] von einer Gleichverteilung von Männer und Frauen ohne Beeinflussung der Autoantikörperhäufigkeiten ausgegangen werden.

Die Abhängigkeit von Alter bzw. Geschlecht und Autoantikörperpositivität in Gesunden wurde bereits 1975 mittel IIF von Shu et al. untersucht. Dabei fanden sich ANA, Anti-PCA-Antikörper und Anti-cytoplasmatische Schilddrüsenantikörper allesamt häufiger bei Älteren und Frauen [166]. Auch in einer kürzlich durchgeführten amerikanischen Studie waren ANA mit ansteigendem Alter und unter Frauen häufiger nachweisbar [148]. Widersprüchlich konnte der Effekt des Alters auf die Präsenz von ANA in Gesunden jedoch in der Studie von Li et al. nicht bestätigt werden [112]. In Bezug auf Anti-TPO-Antikörper gelang Kabelitz et al. der Nachweis jener fast 3-mal öfter in gesunden Mädchen wie Jungen [96]. Dies lässt darauf schließen, dass auch in dieser hier vorliegenden Arbeit mehr Frauen als Männer unter den Autoantikörper Positiven sind. Dieses Bias beeinflusst jedoch die nachgewiesene Kookkurrenz von ANA mit Anti-CCP, Anti-TPO und Anti-Dsg1/3 Antikörper nicht. Fast alle Autoimmunkrankheiten treten häufiger bei Frauen als Männern auf [125, 144]. Dies gilt auch für die hier betrachteten Erkrankungen wie BP [92, 106], Pemphigus [24, 106], Rheumatoide Arthritis [163] und Hashimoto Thyreoditis [187].

Kinder und Personen über 68 Jahren sind in der hier durchgeführten Studie nicht abgebildet. Einerseits liegt die hier dargestellt Prävalenz von Anti-TPO Antikörpern mit 4,6% etwas über der in deutschen Kindern und Jugendlichen ermittelten mit 3,4% [96]. Andererseits ist es möglich, dass aufgrund des jungen Durchschnittsalters die Prävalenz der Antikörper gegen PCA zu niedrig dargestellt wurde. So ist bekannt, dass bei Gesunden die Frequenz der Anti-PCA Antikörper mit dem Alter zunimmt [39, 166].

4.4 Verschiedene krankheitspezifische Autoantikörper überlappen in Gesunden

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine starke Überlappung von ANA mit Anti-CCP, Anti-TPO und Anti-Dsg1/3 Autoantikörpern in gesunden Probanden aufgezeigt werden. Bis dato ist dies die fallzahlenmäßig größte Untersuchung der Assoziation krankheitsspezifischer Autoantikörper in Gesunden. Für die Betrachtung der Konkurrenz wurden zunächst, wie unter Kapitel 4.3 diskutiert, alle Anti-CCP Antikörper ≥ 5 RE/ml berücksichtigt. Anschließend erfolgte zur Verifizierung auch der Vergleich jeglicher gemessener ELISA Ergebnisse zwischen beiden Subpopulationen. Dabei zeigten sich Anti-CCP Antikörperaktivitäten in ANA Positiven signifikant höher als in ANA Negativen ($p < 0,001$).

Beim Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur finden sich hierzu passende Studien von Patienten mit Autoimmunthyreoiditis, bei denen in 30 bis 70% zusätzlich auch ANA im Serum gefunden wurden [85, 178]. Auch SLE Patienten zeigen häufiger schilddrüsenspezifische Autoantikörper als Gesunde [102]. Weiterhin beschrieben Torok et al. in ANA positiven, gesunden Kindern überzufällig häufig und unabhängig von der Höhe des ANA Titers schilddrüsenspezifische Antikörper. Dabei trugen 21% dieser Kinder Anti-TPO-Autoantikörper, wobei nur in 14% eine Hypothyreose vorlag [180]. Als möglichen Mechanismus für die Assoziation von ANA und Autoimmunthyreoiditis kommt die gesteigerte Apoptoserate des Schilddrüsenfollikel epithels mit folgender Freisetzung der nukleären Antigene in Frage [37, 180]. Mit Hilfe verschiedener ELISA und Proteinmikroarray verglichen Li und Kollegen in 18 gesunden Probanden mit hohen ANA Messwerten (> 40 RE/ml) und 16 mit niedrigen ANA (< 12 RE/ml) die Autoantikörper Spiegel gegen ca. 100 weitere Autoantigene. Dabei fanden sie, in Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Daten, in der Subpopulation mit hohen ANA Werten eine Überlappung mit Schilddrüsen- und Hautspezifischen Antikörpern [112]. Eine Assoziation von ANA und Anti-CCP-Autoantikörpern in Gesunden wurde bisher in der Literatur nicht dargelegt. Es ist jedoch bekannt, dass sich bei SLE Patienten mit Arthritis in 20 - 40% Anti-CCP Antikörper nachweisen lassen [140, 205].

Andererseits offenbarten die Daten der hier vorliegenden Untersuchung keine Assoziation zwischen Anti-BP180/230, Anti-PCA Antikörpern sowie ANCA mit ANA. Anti-BP180/230 und Anti-PCA Antikörpern fanden sich zwar häufiger in ANA Positiven, lagen aber mit p-Werten von 0,4 bzw. 0,5 weit von der statistischen Signifikanz entfernt. Interessanterweise traten ANCA in der Gruppe der ANA Positiven seltener auf als bei ANA Negativen. Die Vermutung, dass die Bildung all jener Autoantikörper unabhängig der ANA Produktion verläuft, muss in Hinblick auf das Studiendesign mit Vorsicht getroffen

werden. Das Design besaß wie im Kapitel 2.6 beschrieben, genug statistische Power, um eine mögliche Überlappung zwischen ANA und Anti-TPO Antikörpern nachzuweisen. Für Autoantikörper, deren Häufigkeiten geringer waren als Anti-TPO-AK, kann auf Grundlage dieser Daten trotz fehlender Signifikanz eine mögliche Assoziation nicht sicher ausgeschlossen werden. Bei p-Werten von fast 0,5 erscheint es aber unwahrscheinlich, durch Erhöhung der Kohortengröße für Anti-BP180/230 und Anti-PCA Antikörper eine Assoziation mit ANA nachweisen zu können.

Die gefundene Überlappung mehrerer krankheitsspezifischer Autoantikörper in Gesunden weist auf eine gemeinsame Kontrolle ihres Toleranzverlustes hin. Die Extreme der globalen (für alle Antigene) auf der einen und solitären Toleranzkontrolle (für ein einzelnes Antigen) auf der anderen Seite erscheinen unwahrscheinlich. Gemeinhin werden Genetik und Umwelt als Einflussfaktoren für die Krankheitsentstehung betrachtet. Um eine potentiell gemeinsame genetische Empfänglichkeit gegenüber verschiedenen Autoimmunkrankheiten zu untersuchen, wurden Metaanalysen Genom-weiter Assoziationsstudien durchgeführt. Bestimmte MHC Risikoallele sind für die Autoimmunpathogenese bereits wohl etabliert [125]. Neuere Studien ergründeten auch Risikogene außerhalb des MHC-Locus. So suchten Ramos et al. nach gemeinsamen Risikogenen und Polymorphismen außerhalb des MHC-Locus zwischen SLE-Patienten und 17 weiteren häufigen Autoimmunkrankheiten. Obwohl viele der Autoimmunkrankheiten gewisse Genloci teilen (z.B. IL23R, OLIG3/TNFAIP3 oder IL2RA), konnte keine evidente genetische Überlappung zwischen SLE und anderen Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden [141]. Durch hierarchische Gruppierung der Risikogene erschienen T1DM und RA sowie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa als am meisten genetisch verwandt, hingegen SLE als eigenständig in der genetischen Disposition [141]. Cotsapas et al. analysierten die Assoziation 107 autoimmunpathogenetisch bedeutsamer Single Nucleotid Polymorphism (SNPs) bei sieben verschiedenen Autoimmunkrankheiten (darunter SLE, T1DM, RA und Zöliakie). Nur ein SNP zeigte eine Überlappung zwischen allen sieben Erkrankungen; die meisten erschienen in Untergruppen signifikant assoziiert [49]. Zudem teilen verschiedene Autoimmunkrankheiten auch andere prädisponierende Polymorphismen, wie z.B. für NLRP1, einem wichtigen Regulatorprotein des angeborenen Immunsystems [91].

Insgesamt legen diese Studien eine partielle Pleiotropie, der Veränderung mehrerer phänotypischer Merkmale durch einzelne Gene unter gewissen Autoimmunkrankheiten nahe. Auch die epidemiologischen Ergebnisse dieser hier vorliegenden Arbeit unterstützen damit folgende Hypothese: Die genetische Prädisposition beeinflusst das Erkrankungsrisiko nicht aller, sondern bestimmter Untergruppen von Autoimmunkrankheiten. Es liegt nahe, dass all jene gemeinsame molekulare Mechanismen des Toleranzverlustes und/oder der Krankheitsmanifestation teilen.

5 Zusammenfassung

Für mehrere Autoimmunkrankheiten konnte gezeigt werden, dass Autoantikörper bereits Jahre vor Diagnosestellung im Serum der Patienten nachweisbar sind. Zudem können verschiedene Autoantikörper auch in klinisch Gesunden gefunden werden. Bullöse Autoimmundermatosen sind seltene Autoimmunkrankheiten, bei denen Autoantikörper gegen desmosomale und hemidesmosomale Strukturproteine der Haut gebildet werden und eine intra- bzw. subepidermale Blasenbildung auslösen. Hierbei sind Autoantikörper gegen BP180/230 mit BP und gegen Dsg1/3 mit Pemphigus assoziiert. Bislang ist die Prävalenz der Pemphigoid- und Pemphigus-assoziierten Autoantikörper in Gesunden jedoch weitgehend unbekannt. Außerdem haben vielfältige klinische Studien das überzufällig häufige gleichzeitige Auftreten verschiedener Autoimmunkrankheiten innerhalb eines Patienten belegt. Noch unklar ist jedoch, ob auch Gesunde dazu neigen, verschiedene krankheitsspezifische Autoantikörper gleichzeitig zu bilden.

Zur systematischen Bestimmung der Pemphigoid- und Pemphigus-assoziierten IgG-Autoantikörper wurden insgesamt 7.063 gesunde Blutspender mittels indirekter Immunfluoreszenz auf Anti-BP180/230 und Anti-Dsg1/3 Antikörper untersucht. Alle Positiven und eine vergleichbare Anzahl negativer Proben wurden anschließend durch antigenspezifische ELISA (IgG) reevaluiert. Insgesamt reagierten fast 1% der Gesunden in der Immunfluoreszenz positiv; davon 0,5% mit BP180, 0,04% mit BP230, 0,2% mit Dsg1 und 0,1% mit Dsg3. Die ELISAs bestätigten vorrangig quantitativ niedrige Antikörperspiegel, wobei alle IIF Positiven hochsignifikant höhere ELISA Messwerte aufwiesen als IIF Negative. Passend zu epidemiologischen Daten, die das Bullöse Pemphigoid als häufigste bullöse Autoimmundermatose in Europa beschreiben, konnten BP-assoziierte Autoantikörper öfter nachgewiesen werden als Pemphigus-assoziierte.

Als Grundlage für die Überlappungsanalyse wurden 1.000 Proben auf Antikörper gegen CCP (Rheumatoide Arthritis) und ANCA (Vaskulitiden) sowie 369 davon zusätzlich auf TPO (Autoimmunthyreoditis), PCA (Perniziöse Anämie) und andere Autoimmunendokrinopathien mittels indirekter Immunfluoreszenz oder ELISA getestet. Anschließend wurden die Punktprävalenzen in ANA Positiven und ANA Negativen verglichen. Die ANA positive Kohorte wurde in einer parallel durchgeführten Arbeit charakterisiert. Das erweiterte Screening deckte Autoantikörper gegen TPO in 4,6%, CCP in 1,3%, PCA in 1,1% und ANCA in 0,3% der Blutspender auf. Ferner konnte erstmals eine Kookkurrenz von ANA mit Autoantikörpern gegen TPO, CCP und Dsg1/3 in Gesunden gezeigt werden. Dies lässt auf eine gemeinsame übergeordnete Kontrolle des Toleranzverlustes gegen diese Antigene schließen. ANCA sowie Anti-BP180/230 und Anti-PCA Antikörper traten nicht häufiger in ANA Positiven auf.

Insgesamt reagierten 20% der Gesunden in mindestens einem der durchgeführten Tests positiv. Fast alle getesteten Autoantikörper fanden sich bei Gesunden drastisch häufiger als die Prävalenz der assoziierten Erkrankung. Nur jeder 20. bis 75. Proband würde in Zukunft erkranken. Deshalb sollten Autoantikörpertests gezielt bei Patienten mit krankheitstypischen Symptomen und nicht leichtfertig als Screening eingesetzt werden. Die Frequenz der Anti-CCP Antikörper unter Gesunden lag jedoch nur 3- bis 4-mal über der Prävalenz der seropositiven Rheumatoiden Arthritis. Folglich wäre es ratsam, Gesunde mit Anti-CCP Antikörpern in regelmäßigen Abständen auf erste arthritische Symptome zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Aho, K.; Heliövaara, M.; Maatela, J.; Tuomi, T.; Palosuo, T. (1991): Rheumatoid factors antedating clinical rheumatoid arthritis. In: *J. Rheumatol.* 18 (9), S. 1282–1284.
- 2 Alessandri, C.; Conti, F.; Conigliaro, P.; Mancini, R.; Massaro, L.; Valesini, G. (2009): Seronegative Autoimmune Diseases. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1173 (1), S. 52–59.
- 3 Altmeyer, Peter (2011): Enzyklopädie Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin. 2. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin.
- 4 Amagai, M.; Ahmed, A. R.; Kitajima, Y.; Bystryn, J. C.; Milner, Y.; Gniadecki, R. et al. (2006): Are desmoglein autoantibodies essential for the immunopathogenesis of pemphigus vulgaris, or just 'witnesses of disease'? In: *Experimental Dermatology* 15 (10), S. 815.
- 5 Amagai, M.; Hashimoto, T.; Green, K. J.; Shimizu, N.; Nishikawa, T. (1995): Antigen-specific immunoabsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. In: *J Invest Dermatol* 104 (6), S. 895–901.
- 6 Amagai, M.; Hashimoto, T.; Shimizu, N.; Nishikawa, T. (1994): Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by baculovirus. In: *J Clin Invest* 94 (1), S. 59–67.
- 7 Amagai, M.; Karpati, S.; Prussick, R.; Klaus-Kovtun, V.; Stanley, J. R. (1992): Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. In: *J. Clin. Invest.* 90 (3), S. 919–926.
- 8 Amagai, M.; Klaus-Kovtun, V.; Stanley, J. R. (1991): Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. In: *Cell* 67 (5), S. 869–877.
- 9 Amagai, M.; Koch, P. J.; Nishikawa, T.; Stanley, J. R. (1996): Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. In: *J. Invest. Dermatol.* 106 (2), S. 351–355.
- 10 Amagai, M.; Komai, A.; Hashimoto, T.; Shirakata, Y.; Hashimoto, K.; Yamada, T. et al. (1999): Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. In: *Br J Dermatol* 140 (2), S. 351–357.
- 11 Amagai, M.; Tsunoda, K.; Suzuki, H.; Nishifuji, K.; Koyasu, S.; Nishikawa, T. (2000): Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. In: *J. Clin. Invest.* 105 (5), S. 625–631.
- 12 Amagai, M.; Tsunoda, K.; Zillikens, D.; Nagai, T.; Nishikawa, T. (1999): The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. In: *J. Am. Acad. Dermatol.* 40 (2 Pt 1), S. 167–170.
- 13 Ameglio, F.; D'Auria, L.; Bonifati, C.; Ferraro, C.; Mastroianni, A.; Giacalone, B. (1998): Cytokine pattern in blister fluid and serum of patients with bullous pemphigoid: relationships with disease intensity. In: *Br J Dermatol* 138 (4), S. 611–614.
- 14 Anhalt, G. J.; Labib, R. S.; Voorhees, J. J.; Beals, T. F.; Diaz, L. A. (1982): Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. In: *N. Engl. J. Med.* 306 (20), S. 1189–1196.
- 15 Anhalt, G. J.; Till, G. O.; Diaz, L. A.; Labib, R. S.; Patel, H. P.; Eaglstein, N. F. (1986): Defining the role of complement in experimental pemphigus vulgaris in mice. In: *J. Immunol.* 137 (9), S. 2835–2840.

- 16 Aoyama, Y.; Owada, M. K.; Kitajima, Y. (1999): A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. In: *Eur. J. Immunol.* 29 (7), S. 2233–2240.
- 17 Arbuckle, M. R.; McClain, M. T.; Rubertone, M. V.; Scofield, R. Hal; Dennis, G. J.; James, J. A.; Harley, J. B. (2003): Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. In: *N Engl J Med* 349 (16), S. 1526–1533.
- 18 Atsma, F.; Veldhuizen, I.; Vegt, F. de; Doggen, C.; Kort, W. de (2011): Cardiovascular and demographic characteristics in whole blood and plasma donors: results from the Donor InSight study. In: *Transfusion* 51 (2), S. 412–420.
- 19 Avalos-Diaz, E.; Olague-Marchan, M.; Lopez-Swidorski, A.; Herrera-Esparza, R.; Diaz, L. A. (2000): Transplacental passage of maternal pemphigus foliaceus autoantibodies induces neonatal pemphigus. In: *J Am Acad Dermatol* 43 (6), S. 1130–1134.
- 20 Avrameas, S. (1991): Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. In: *Immunol. Today* 12 (5), S. 154–159.
- 21 Avrameas, S.; Ternynck, T. (1995): Natural autoantibodies: the other side of the immune system. In: *Res. Immunol.* 146 (4-5), S. 235–248.
- 22 Bach, J.-F. (2002): The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases. In: *N Engl J Med* 347 (12), S. 911–920.
- 23 Baroni, A.; Buommino, E.; Paoletti, I.; Orlando, M.; Ruocco, E.; Ruocco, V. (2004): Pemphigus serum and captopril induce heat shock protein 70 and inducible nitric oxide synthase overexpression, triggering apoptosis in human keratinocytes. In: *Br. J. Dermatol.* 150 (6), S. 1070–1080.
- 24 Bastuji-Garin, S.; Souissi, R.; Blum, L.; Turki, H.; Nouria, R.; Jomaa, B. et al. (1995): Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women. In: *J. Invest. Dermatol.* 104 (2), S. 302–305.
- 25 Bektas, M.; Jolly, P.; Rubenstein, D. S. (2010): Apoptotic pathways in pemphigus. In: *Dermatol Res Pract* 2010, S. 456841.
- 26 Bendixen, G.; Hadidi, T.; Manthorpe, R.; Permin, H.; Struckmann, J.; Wilk, A.; Zaghloul, M. (1984): Antibodies against nuclear components in schistosomiasis. Results compared to values in patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and osteoarthritis. In: *Allergy* 39 (2), S. 107–113.
- 27 Berkowitz, P.; Diaz, L. A.; Hall, R. P.; Rubenstein, D. S. (2007): Induction of p38MAPK and HSP27 Phosphorylation in Pemphigus Patient Skin. In: *J Investig Dermatol* 128 (3), S. 738–740.
- 28 Berkowitz, P.; Hu, P.; Liu, Z.; Diaz, L. A.; Enghild, J. J.; Chua, M. P.; Rubenstein, D. S. (2005): Desmosome Signaling: Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (25), S. 23778–23784.
- 29 Berkowitz, P.; Hu, P.; Warren, S.; Liu, Z.; Diaz, L. A.; Rubenstein, D. S. (2006): p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (34), S. 12855–12860.
- 30 Bernard, P.; Vaillant, L.; Labeille, B.; Bedane, C.; Arbeille, B.; Denoeux, J. P. et al. (1995): Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group. In: *Arch Dermatol* 131 (1), S. 48–52.
- 31 Bertram, F.; Bröcker, E.-B.; Zillikens, D.; Schmidt, E. (2009): Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. In: *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 7 (5), S. 434–439.

- 32 Bhol, K.; Natarajan, K.; Nagarwalla, N.; Mohimen, A.; Aoki, V.; Ahmed, A. R. (1995): Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenic and nonpathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris: a model for autoimmunity. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (11), S. 5239–5243.
- 33 Bieber, K.; Sun, S.; Ishii, N.; Kasperkiewicz, M.; Schmidt, E.; Hirose, M. et al. (2010): Animal models for autoimmune bullous dermatoses. In: *Exp. Dermatol.* 19 (1), S. 2–11.
- 34 Blöcker, I. M.; Dähnrich, C.; Probst, C.; Komorowski, L.; Saschenbrecker, S.; Schlumberger, W. et al. (2012): Epitope mapping of BP230 leading to a novel enzyme-linked immunosorbent assay for autoantibodies in bullous pemphigoid. In: *Br. J. Dermatol.* 166 (5), S. 964–970.
- 35 Boelaert, K.; Newby, P. R.; Simmonds, M. J.; Holder, R. L.; Carr-Smith, J. D.; Heward, J. M. et al. (2010): Prevalence and Relative Risk of Other Autoimmune Diseases in Subjects with Autoimmune Thyroid Disease. In: *The American Journal of Medicine* 123 (2), S. 183.e1.
- 36 Borradori, L.; Sonnenberg, A. (1999): Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. In: *J. Invest. Dermatol.* 112 (4), S. 411–418.
- 37 Bossowski, A.; Czarnocka, B.; Bardadin, K.; Stasiak-Barmuta, A.; Urban, M.; Dadan, J. et al. (2008): Identification of apoptotic proteins in thyroid gland from patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. In: *Autoimmunity* 41 (2), S. 163–173.
- 38 Bundesärztekammer in Kooperation mit Paul-Ehrlich-Institut (2010): Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). Gesamtnovelle 2005; mit Richtlinienanpassung 2010. Köln: Dt. Ärzte-Verlag.
- 39 Cabrera de León, A.; Almeida González, D.; Almeida, A. Arencibia; González Hernández, A.; Carretero Pérez, M.; Rodríguez Pérez, M. del Cristo et al. (2012): Factors associated with parietal cell autoantibodies in the general population. In: *Immunology Letters* 147 (1-2), S. 63–66.
- 40 Cacciapaglia, F.; Arcarese, L.; Rigon, A.; Vadacca, M.; Valorani, M. G.; Pozzilli, P.; Afeltra, A. (2008): Antinuclear antibodies prevalence in Filipinos migrated to Italy. In: *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 12 (4), S. 267–270.
- 41 Caldelari, R.; Bruin, A. de; Baumann, D.; Suter, M. M.; Bierkamp, C.; Balmer, V.; Müller, E. (2001): A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris. In: *J. Cell Biol.* 153 (4), S. 823–834.
- 42 Calkins, C. C.; Setzer, S. V.; Jennings, J. Marie; Summers, S.; Tsunoda, K.; Amagai, M.; Kowalczyk, A. P. (2006): Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. In: *J. Biol. Chem.* 281 (11), S. 7623–7634.
- 43 Chan, P. T.; Ohyama, B.; Nishifuji, K.; Yoshida, K.; Ishii, K.; Hashimoto, T.; Amagai, M. (2010): Immune response towards the amino-terminus of desmoglein 1 prevails across different activity stages in nonendemic pemphigus foliaceus. In: *Br. J. Dermatol.* 162 (6), S. 1242–1250.
- 44 Chen, G.; Wang, Y.; Qiu, L.; Qin, X.; Liu, H.; Wang, X. et al. (2012): Human IgG Fc-glycosylation profiling reveals associations with age, sex, female sex hormones and thyroid cancer. In: *J Proteomics* 75 (10), S. 2824–2834.
- 45 Chernyavsky, A. I.; Arredondo, J.; Kitajima, Y.; Sato-Nagai, M.; Grando, S. A. (2007): Desmoglein Versus Non-desmoglein Signaling in Pemphigus Acantholysis: Characterization of Novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens. In: *Journal of Biological Chemistry* 282 (18), S. 13804–13812.
- 46 Collin, M.; Ehlers, M. (2013): The carbohydrate switch between pathogenic and immunosuppressive antigen-specific antibodies. In: *Exp Dermatol* 22 (8), S. 511–514.

- 47 Cooper, G. S.; Bynum, M. L.K; Somers, E. C. (2009): Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: Improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. In: *Journal of Autoimmunity* 33 (3-4), S. 197–207.
- 48 Cortés, B.; Marazza, G.; Naldi, L.; Combesure, C.; Borradori, L. (2011): Mortality of bullous pemphigoid in Switzerland: a prospective study. In: *Br. J. Dermatol.* 165 (2), S. 368–374.
- 49 Cotsapas, C.; Voight, B. F.; Rossin, E.; Lage, K.; Neale, B. M.; Wallace, C. et al. (2011): Pervasive Sharing of Genetic Effects in Autoimmune Disease. In: *PLoS Genet* 7 (8), S. e1002254.
- 50 Cozzani, E.; Parodi, A.; Rebora, A.; Delmonte, S.; Barile, M.; Nigro, A. et al. (2001): Bullous pemphigoid in Liguria: a 2-year survey. In: *J Eur Acad Dermatol Venereol* 15 (4), S. 317–319.
- 51 Csernok, E.; Holle, J.; Hellmich, B.; Willem, J.; Tervaert, C.; Kallenberg, C. G. M. et al. (2004): Evaluation of capture ELISA for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3 in Wegener's granulomatosis: first results from a multicentre study. In: *Rheumatology (Oxford)* 43 (2), S. 174–180.
- 52 Damoiseaux, J.; van Rijsingen, M.; Warnemünde, N.; Dährnich, C.; Fechner, K.; Cohen Tervaert, J. Willem (2012): Autoantibody detection in bullous pemphigoid: Clinical evaluation of the EUROPLUS™ Dermatology Mosaic. In: *Journal of Immunological Methods* 382 (1-2), S. 76–80.
- 53 Desai, N.; Allen, J.; Ali, I.; Venning, V.; Wojnarowska, F. (2008): Autoantibodies to basement membrane proteins BP180 and BP230 are commonly detected in normal subjects by immunoblotting. In: *Australas. J. Dermatol.* 49 (3), S. 137–141.
- 54 Di Zenzo, G.; Grosso, F.; Terracina, M.; Mariotti, F.; Pita, O. de; Owaribe, K. et al. (2004): Characterization of the anti-BP180 autoantibody reactivity profile and epitope mapping in bullous pemphigoid patients. In: *J Invest Dermatol* 122 (1), S. 103–110.
- 55 Di Zenzo, G.; Thoma-Uszynski, S.; Fontao, L.; Calabresi, V.; Hofmann, S. C.; Hellmark, T. et al. (2008): Multicenter prospective study of the humoral autoimmune response in bullous pemphigoid. In: *Clin. Immunol.* 128 (3), S. 415–426.
- 56 Diaz, L. A.; Ratrie, H.; Saunders, W. S.; Futamura, S.; Squiquera, H. L.; Anhalt, G. J.; Giudice, G. J. (1990): Isolation of a human epidermal cDNA corresponding to the 180-kD autoantigen recognized by bullous pemphigoid and herpes gestationis sera. Immunolocalization of this protein to the hemidesmosome. In: *J. Clin. Invest.* 86 (4), S. 1088–1094.
- 57 Ding, X.; Diaz, L. A.; Fairley, J. A.; Giudice, G. J.; Liu, Z. (1999): The Anti-Desmoglein 1 Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris Sera are Pathogenic. In: *J Investig Dermatol* 112 (5), S. 739–743.
- 58 Döpp, R.; Schmidt, E.; Chimanovitch, I.; Leverkus, M.; Bröcker, E. B.; 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. In: *J. Am. Acad. Dermatol.* 42 (4), S. 577–583.
- 59 Eaton, W. W.; Rose, N. R.; Kalaydjian, A.; Pedersen, M. G.; Mortensen, P. Bo (2007): Epidemiology of autoimmune diseases in Denmark. In: *J. Autoimmun.* 29 (1), S. 1–9.
- 60 Elkayam, O.; Caspi, D.; Lidgi, M.; Segal, R. (2007): Auto-antibody profiles in patients with active pulmonary tuberculosis. In: *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 11 (3), S. 306–310.
- 61 Eriksson, C.; Kokkonen, H.; Johansson, M.; Hallmans, G.; Wadell, G.; Rantapää-Dahlqvist, S. (2011): Autoantibodies predate the onset of systemic lupus erythematosus in northern Sweden. In: *Arthritis Res Ther* 13 (1), S. R30.

- 62 Evangelista, F.; Dasher, D. A.; Diaz, L. A.; Prisanh, P. S.; Li, N. (2008): E-cadherin Is an Additional Immunological Target for Pemphigus Autoantibodies. In: *J Invest Dermatol* 128 (7), S. 1710–1718.
- 63 Eyre, R. W.; Stanley, J. R. (1987): Human autoantibodies against a desmosomal protein complex with a calcium-sensitive epitope are characteristic of pemphigus foliaceus patients. In: *J Exp Med* 165 (6), S. 1719–1724.
- 64 Eyre, R. W.; Stanley, J. R. (1988): Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen. In: *J Clin Invest* 81 (3), S. 807–812.
- 65 Fairley, J. A.; Baum, C. L.; Brandt, D. S.; Messingham, K. A.N (2009): Pathogenicity of IgE in autoimmunity: Successful treatment of bullous pemphigoid with omalizumab. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123 (3), S. 704–705.
- 66 Fairley, J. A.; Burnett, C. T.; Fu, C.-L.; Larson, D. L.; Fleming, M. G.; Giudice, G. J. (2007): A Pathogenic Role for IgE in Autoimmunity: Bullous Pemphigoid IgE Reproduces the Early Phase of Lesion Development in Human Skin Grafted to nu/nu Mice. In: *J Invest Dermatol* 127 (11), S. 2605–2611.
- 67 Frodlund, M.; Dahlstrom, O.; Kastbom, A.; Skogh, T.; Sjowall, C. (2013): Associations between antinuclear antibody staining patterns and clinical features of systemic lupus erythematosus: analysis of a regional Swedish register. In: *BMJ Open* 3 (10), S. e003608.
- 68 Fröhlich-Reiterer, E. E.; Huber, J.; Katz, H.; Suppan, E.; Obermayer-Pietsch, B.; Deutschmann, A. et al. (2011): Do Children and Adolescents With Type 1 Diabetes Mellitus Have a Higher Frequency of Parietal Cell Antibodies Than Healthy Controls? In: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 52 (5), S. 558–562.
- 69 Frusic-Zlotkin, M.; Pergamentz, R.; Michel, B.; David, M.; Mimouni, D.; Brégégère, F.; Milner, Y. (2005): The interaction of pemphigus autoimmunoglobulins with epidermal cells: activation of the fas apoptotic pathway and the use of caspase activity for pathogenicity tests of pemphigus patients. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1050, S. 371–379.
- 70 Funakoshi, T.; Lunardon, L.; Ellebrecht, C.; Nagler, A.; O’Leary, C.; Payne, A. (2012): Enrichment of total serum IgG4 in patients with pemphigus. In: *British Journal of Dermatology* 167 (6), S. 1245–1253.
- 71 Gammon, W. R.; Merritt, C. C.; Lewis, D. M.; Sams, W. M., JR; Carlo, J. R.; Wheeler, C. E., JR (1982): An in vitro model of immune complex-mediated basement membrane zone separation caused by pemphigoid antibodies, leukocytes, and complement. In: *J Invest Dermatol* 78 (4), S. 285–290.
- 72 Giudice, G. J.; Emery, D. J.; Zelickson, B. D.; Anhalt, G. J.; Liu, Z.; Diaz, L. A. (1993): Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. In: *J. Immunol.* 151 (10), S. 5742–5750.
- 73 Goodnow, C. C.; Sprent, J.; St Groth, B. Fazekas de; Vinuesa, C. G. (2005): Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. In: *Nature* 435 (7042), S. 590–597.
- 74 Grando, S. A. (2012): Pemphigus autoimmunity: hypotheses and realities. In: *Autoimmunity* 45 (1), S. 7–35.
- 75 Grönwall, C.; Vas, J.; Silverman, G. J. (2012): Protective Roles of Natural IgM Antibodies. In: *Front. Immun.* 3.
- 76 Gudi, V. S.; White, M. I.; Cruickshank, N.; Herriot, R.; Edwards, S. L.; Nimmo, F.; Ormerod, A. D. (2005): Annual incidence and mortality of bullous pemphigoid in the Grampian Region of North-east Scotland. In: *Br. J. Dermatol.* 153 (2), S. 424–427.

- 77 Gushi, M.; Yamamoto, Y.-I.; Mine, Y.; Awazawa, R.; Nonaka, K.; Taira, K. et al. (2008): Neonatal pemphigus vulgaris. In: *J Dermatol* 35 (8), S. 529–535.
- 78 Harman, K. E.; Seed, P. T.; Gratian, M. J.; Bhogal, B. S.; Challacombe, S. J.; Black, M. M. (2001): The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. In: *Br. J. Dermatol.* 144 (4), S. 775–780.
- 79 Hashimoto, T.; Ogawa, M. M.; Konohana, A.; Nishikawa, T. (1990): Detection of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antigens by immunoblot analysis using different antigen sources. In: *J. Invest. Dermatol.* 94 (3), S. 327–331.
- 80 Haury, M.; Sundblad, A.; Grandien, A.; Barreau, C.; Coutinho, A.; Nobrega, A. (1997): The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. In: *Eur. J. Immunol.* 27 (6), S. 1557–1563.
- 81 Heupel, W.-M.; Zillikens, D.; Drenckhahn, D.; Waschke, J. (2008): Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. In: *J Immunol* 181 (3), S. 1825–1834.
- 82 Hirose, M.; Recke, A.; Beckmann, T.; Shimizu, A.; Ishiko, A.; Bieber, K. et al. (2011): Repetitive Immunization Breaks Tolerance to Type XVII Collagen and Leads to Bullous Pemphigoid in Mice. In: *The Journal of Immunology* 187 (3), S. 1176–1183.
- 83 Hofmann, S. C.; Thoma-Uszynski, S.; Hunziker, T.; Bernard, P.; Koebnick, C.; Stauber, A. et al. (2002): Severity and Phenotype of Bullous Pemphigoid Relate to Autoantibody Profile Against the NH₂- and COOH-Terminal Regions of the BP180 Ectodomain. In: *J Invest Dermatol* 119 (5), S. 1065–1073.
- 84 Hogquist, K. A.; Baldwin, T. A.; Jameson, S. C. (2005): Central tolerance: learning self-control in the thymus. In: *Nat Rev Immunol* 5 (10), S. 772–782.
- 85 Inamo, Y.; Harada, K. (1997): Antinuclear antibody positivity in pediatric patients with autoimmune thyroid disease. In: *J. Rheumatol.* 24 (3), S. 576–578.
- 86 Institut für Sozialmedizin und Institut für klinische Epidemiologie, U. Campus Lübeck: Blockpraktikum "Evidenzbasierte Medizin". Kursunterlagen. Sommersemester 2012.
- 87 Ishii, K.; Amagai, M.; Hall, R. P.; Hashimoto, T.; Takayanagi, A.; Gamou, S. et al. (1997): Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. In: *J. Immunol.* 159 (4), S. 2010–2017.
- 88 Iwata, H.; Kamio, N.; Aoyama, Y.; Yamamoto, Y.; Hirako, Y.; Owaribe, K.; Kitajima, Y. (2009): IgG from Patients with Bullous Pemphigoid Depletes Cultured Keratinocytes of the 180-kDa Bullous Pemphigoid Antigen (Type XVII Collagen) and Weakens Cell Attachment. In: *J Invest Dermatol* 129 (4), S. 919–926.
- 89 Iwata, Y.; Komura, K.; Kodera, M.; Usuda, T.; Yokoyama, Y.; Hara, T. et al. (2008): Correlation of IgE Autoantibody to BP180 With a Severe Form of Bullous Pemphigoid. In: *Arch Dermatol* 144 (1).
- 90 Jacobson, D. L.; Gange, S. J.; Rose, N. R.; Graham, N. M. (1997): Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. In: *Clin Immunol Immunopathol* 84 (3), S. 223–243.
- 91 Jin, Y.; Mailloux, C. M.; Gowan, K.; Riccardi, S. L.; LaBerge, G.; Bennett, D. C. et al. (2007): NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. In: *N. Engl. J. Med.* 356 (12), S. 1216–1225.
- 92 Joly, P.; Baricault, S.; Sparsa, A.; Bernard, P.; Bédane, C.; Duvert-Lehembre, S. et al. (2012): Incidence and Mortality of Bullous Pemphigoid in France. In: *J Invest Dermatol* 132 (8), S. 1998–2004.
- 93 Jordon, R. E. (1967): Basement Zone Antibodies in Bullous Pemphigoid. In: *JAMA* 200 (9), S. 751.

- 94 Jordon, R. E.; Schroeter, A. L.; Rogers, R. S.; Perry, H. O. (1974): Classical and alternate pathway activation of complement in pemphigus vulgaris lesions. In: *J. Invest. Dermatol.* 63 (3), S. 256–259.
- 95 Jung, M.; Kippes, W.; Messer, G.; Zillikens, D.; Rzany, B. (1999): Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence. In: *J. Am. Acad. Dermatol.* 41 (2 Pt 1), S. 266–268.
- 96 Kabelitz, M.; Liesenkötter, K. P.; Stach, B.; Willgerodt, H.; Stäblein, W.; Singendonk, W. et al. (2003): The prevalence of anti-thyroid peroxidase antibodies and autoimmune thyroiditis in children and adolescents in an iodine replete area. In: *Eur. J. Endocrinol.* 148 (3), S. 301–307.
- 97 Kelly, S. E.; Wojnarowska, F. (1988): The use of chemically split tissue in the detection of circulating anti-basement membrane zone antibodies in bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid. In: *Br. J. Dermatol.* 118 (1), S. 31–40.
- 98 Kobayashi, M.; Amagai, M.; Kuroda-Kinoshita, K.; Hashimoto, T.; Shirakata, Y.; Hashimoto, K.; Nishikawa, T. (2002): BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. In: *J. Dermatol. Sci.* 30 (3), S. 224–232.
- 99 Korman, N. J.; Eyre, R. W.; Klaus-Kovtun, V.; Stanley, J. R. (1989): Demonstration of an adhering-junction molecule (plakoglobin) in the autoantigens of pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris. In: *N. Engl. J. Med.* 321 (10), S. 631–635.
- 100 Kromminga, A.; Scheckenbach, C.; Georgi, M.; Hagel, C.; Arndt, R.; Christophers, E. et al. (2000): Patients with bullous pemphigoid and linear IgA disease show a dual IgA and IgG autoimmune response to BP180. In: *J. Autoimmun.* 15 (3), S. 293–300.
- 101 Kromminga, A.; Sitaru, C.; Hagel, C.; Herzog, S.; Zillikens, D. (2004): Development of an ELISA for the detection of autoantibodies to BP230. In: *Clin Immunol* 111 (1), S. 146–152.
- 102 Kumar, K.; Kole, A. Kumar; Karmakar, P. Sarathi; Ghosh, A. (2012): The spectrum of thyroid disorders in systemic lupus erythematosus. In: *Rheumatol Int* 32 (1), S. 73–78.
- 103 Kyewski, B.; Klein, L. (2006): A central role for central tolerance. In: *Annu. Rev. Immunol.* 24, S. 571–606.
- 104 Labib, R. S.; Anhalt, G. J.; Patel, H. P.; Mutasim, D. F.; Diaz, L. A. (1986): Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. In: *J Immunol* 136 (4), S. 1231–1235.
- 105 Lacroix-Desmazes, S.; Kaveri, S. V.; Mouthon, L.; Ayoub, A.; Malanchère, E.; Coutinho, A.; Kazatchkine, M. D. (1998): Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. In: *J. Immunol. Methods* 216 (1-2), S. 117–137.
- 106 Langan, S. M.; Smeeth, L.; Hubbard, R.; Fleming, K. M.; Smith, C. J. P.; West, J. (2008): Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. In: *BMJ* 337 (jul09 1), S. a180.
- 107 Lee, H. E.; Berkowitz, P.; Jolly, P. S.; Diaz, L. A.; Chua, M. P.; Rubenstein, D. S. (2009): Biphasic Activation of p38MAPK Suggests That Apoptosis Is a Downstream Event in Pemphigus Acantholysis. In: *Journal of Biological Chemistry* 284 (18), S. 12524–12532.
- 108 Liao, K. P.; Gunnarsson, M.; Källberg, H.; Ding, B.; Plenge, R. M.; Padyukov, L. et al. (2009): Specific association of type 1 diabetes mellitus with anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis. In: *Arthritis Rheum* 60 (3), S. 653–660.
- 109 Li, N.; Aoki, V.; Hans-Filho, G.; Rivitti, E. A.; Diaz, L. A. (2003): The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). In: *J. Exp. Med.* 197 (11), S. 1501–1510.

- 110 Lin, L.; Bankaitis, E.; Heimbach, L.; Li, N.; Abrink, M.; Pejler, G. et al. (2011): Dual Targets for Mouse Mast Cell Protease-4 in Mediating Tissue Damage in Experimental Bullous Pemphigoid. In: *Journal of Biological Chemistry* 286 (43), S. 37358–37367.
- 111 Lin, M. S.; Fu, C. L.; Giudice, G. J.; Olague-Marchan, M.; Lazaro, A. M.; Stastny, P.; Diaz, L. A. (2000): Epitopes targeted by bullous pemphigoid T lymphocytes and autoantibodies map to the same sites on the bullous pemphigoid 180 ectodomain. In: *J. Invest. Dermatol.* 115 (6), S. 955–961.
- 112 Li, Q.-Z.; Karp, D. R.; Quan, J.; Branch, V. K.; Zhou, J.; Lian, Y. et al. (2011): Risk factors for ANA positivity in healthy persons. In: *Arthritis Res Ther* 13 (2), S. R38.
- 113 Liu, Z.; Diaz, L. A.; Troy, J. L.; Taylor, A. F.; Emery, D. J.; Fairley, J. A.; Giudice, G. J. (1993): A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. In: *J. Clin. Invest.* 92 (5), S. 2480–2488.
- 114 Liu, Z.; Zhou, X.; Shapiro, S. D.; Shipley, J. M.; Twining, S. S.; Diaz, L. A. et al. (2000): The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. In: *Cell* 102 (5), S. 647–655.
- 115 Lucchese, A.; Mittelman, A.; Tessitore, L.; Serpico, R.; Sinha, A. A.; Kanduc, D. (2006): Proteomic definition of a desmoglein linear determinant common to Pemphigus vulgaris and Pemphigus foliaceus. In: *J Transl Med* 4, S. 37.
- 116 Mackay, I. R. (1992): Burnet oration. Autoimmunity: paradigms of Burnet and complexities of today. In: *Immunol. Cell Biol.* 70 (Pt 3), S. 159–171.
- 117 Mackay, I. R. (2007): Autoimmunity since the 1957 clonal selection theory: a little acorn to a large oak. In: *Immunol Cell Biol* 86 (1), S. 67–71.
- 118 Madi, A.; Bransburg-Zabary, S.; Kenett, D. Y.; Ben-Jacob, E.; Cohen, I. R.: The Natural Autoantibody Repertoire in Newborns and Adults, Bd. 750, S. 198–212.
- 119 Mahoney, M. G.; Wang, Z.; Rothenberger, K.; Koch, P. J.; Amagai, M.; Stanley, J. R. (1999): Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. In: *J. Clin. Invest.* 103 (4), S. 461–468.
- 120 Mao, X.; Choi, E. Jung; Payne, A. S. (2008): Disruption of Desmosome Assembly by Monovalent Human Pemphigus Vulgaris Monoclonal Antibodies. In: *J Investig Dermatol* 129 (4), S. 908–918.
- 121 Marazza, G.; Pham, H. C.; Schärer, L.; Pedrazzetti, P. P.; Hunziker, T.; Trüeb, R. M. et al. (2009): Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study. In: *Br. J. Dermatol.* 161 (4), S. 861–868.
- 122 Merbl, Y.; Zucker-Toledano, M.; Quintana, F. J.; Cohen, I. R. (2007): Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. In: *J. Clin. Invest.* 117 (3), S. 712–718.
- 123 Meyer, N.; Misery, L. (2010): Geoepidemiologic considerations of auto-immune pemphigus. In: *Autoimmunity Reviews* 9 (5), S. A379.
- 124 Mühlen, C. A. von; Tan, E. M. (1995): Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. In: *Semin. Arthritis Rheum.* 24 (5), S. 323–358.
- 125 Murphy, Kenneth; Janeway, Charles A.; Travers, Paul; Walport, Mark (2012): Janeway's immunobiology. 8. Aufl. Oxford: Taylor & Francis.
- 126 Myckatyn, S. O.; Russell, A. S. (2003): Outcome of positive antinuclear antibodies in individuals without connective tissue disease. In: *J Rheumatol* 30 (4), S. 736–739.
- 127 Nagasaka, T.; Nishifuji, K.; Ota, T.; Whittock, N. V.; Amagai, M. (2004): Defining the pathogenic involvement of desmoglein 4 in pemphigus and staphylococcal scalded skin syndrome. In: *J. Clin. Invest.* 114 (10), S. 1484–1492.

- 128 Nagele, E. P.; Han, M.; Acharya, N. K.; DeMarshall, C.; Kosciuk, M. C.; Nagele, R. G.; Tsokos, G. C. (2013): Natural IgG Autoantibodies Are Abundant and Ubiquitous in Human Sera, and Their Number Is Influenced By Age, Gender, and Disease. In: *PLoS ONE* 8 (4), S. e60726.
- 129 Nanda, A.; Dvorak, R.; Al-Saeed, K.; Al-Sabah, H.; Alsaleh, Q. A. (2004): Spectrum of autoimmune bullous diseases in Kuwait. In: *Int. J. Dermatol.* 43 (12), S. 876–881.
- 130 Narciso-Schiavon, J. L.; Freire, F. Caruso F.; Suarez, M. Mendes; Ferrari, M. Vinícius O.; Scanhola, G. Quirino; Schiavon, L. de Lucca et al. (2009): Antinuclear antibody positivity in patients with chronic hepatitis C: clinically relevant or an epiphenomenon? In: *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 21 (4), S. 440–446.
- 131 Nguyen, V. T.; Ndoeye, A.; Grando, S. A. (2000): Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity. In: *Am. J. Pathol.* 157 (4), S. 1377–1391.
- 132 Nguyen, V. T.; Ndoeye, A.; Grando, S. A. (2000): Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin. A novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. In: *J. Biol. Chem.* 275 (38), S. 29466–29476.
- 133 Nguyen, V. T.; Ndoeye, A.; Shultz, L. D.; Pittelkow, M. R.; Grando, S. A. (2000): Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris-like lesions. In: *J. Clin. Invest.* 106 (12), S. 1467–1479.
- 134 Pelacho, B.; Natal, C.; España, A.; Sánchez-Carpintero, I.; Iraburu, M. J.; López-Zabalza, M. J. (2004): Pemphigus vulgaris autoantibodies induce apoptosis in HaCaT keratinocytes. In: *FEBS Lett.* 566 (1-3), S. 6–10.
- 135 Perriard, J.; Jaunin, F.; Favre, B.; Budinger, L.; Hertl, M.; Saurat, J.-H.; Borradori, L. (1999): IgG Autoantibodies from Bullous Pemphigoid (BP) Patients Bind Antigenic Sites on Both the Extracellular and the Intracellular Domains of the BP Antigen 180. In: *J Invest Dermatol* 112 (2), S. 141–147.
- 136 Probst, C.; Schlumberger, W.; Stöcker, W.; Recke, A.; Schmidt, E.; Hashimoto, T. et al. (2009): Development of ELISA for the specific determination of autoantibodies against envoplakin and periplakin in paraneoplastic pemphigus. In: *Clinica Chimica Acta* 410 (1-2), S. 13–18.
- 137 Prüßmann, J.; Prüßmann, W.; Recke, A.; Rentzsch, K.; Juhl, D.; Henschler, R. et al. (2014): Co-occurrence of autoantibodies in healthy blood donors. In: *Exp. Dermatol.* 23 (7), S. 519–521.
- 138 Puszczewicz, M.; Iwaszkiewicz, C. (2011): Role of anti-citrullinated protein antibodies in diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. In: *aoms* 2, S. 189–194.
- 139 Puviani, M.; Marconi, A.; Cozzani, E.; Pincelli, C. (2003): Fas ligand in pemphigus sera induces keratinocyte apoptosis through the activation of caspase-8. In: *J. Invest. Dermatol.* 120 (1), S. 164–167.
- 140 Qing, Y.-F.; Zhang, Q.-B.; Zhou, J.-G.; Yuan, G.-H.; Wei, J.; Xing, Y. et al. (2009): The detecting and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. In: *Lupus* 18 (8), S. 713–717.
- 141 Ramos, P. S.; Criswell, L. A.; Moser, K. L.; Comeau, M. E.; Williams, A. H.; Pajewski, N. M. et al. (2011): A Comprehensive Analysis of Shared Loci between Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and Sixteen Autoimmune Diseases Reveals Limited Genetic Overlap. In: *PLoS Genet* 7 (12), S. e1002406.
- 142 Rantapää-Dahlqvist, S.; Jong, B. A. W. de; Berglin, E.; Hallmans, G.; Wadell, G.; Stenlund, H. et al. (2003): Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. In: *Arthritis & Rheumatism* 48 (10), S. 2741–2749.

- 143 Rispens, T.; den Bleker, T. H.; Aalberse, R. C. (2010): Hybrid IgG4/IgG4 Fc antibodies form upon 'Fab-arm' exchange as demonstrated by SDS-PAGE or size-exclusion chromatography. In: *Mol. Immunol.* 47 (7-8), S. 1592–1594.
- 144 Roberts-Thomson, P. J.; Jackson, M. W.; Gordon, T. P. (2011): A seminal monograph: Mackay and Burnet's Autoimmune diseases. In: *Med J Aust* 196 (1), S. 74–76.
- 145 Rock, B.; Martins, C. R.; Theofilopoulos, A. N.; Balderas, R. S.; Anhalt, G. J.; Labib, R. S. et al. (1989): The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). In: *N. Engl. J. Med.* 320 (22), S. 1463–1469.
- 146 Rombouts, Y.; Ewing, E.; van de Stadt, L. A.; Selman, M. H. J.; Trouw, L. A.; Deelder, A. M. et al. (2013): Anti-citrullinated protein antibodies acquire a pro-inflammatory Fc glycosylation phenotype prior to the onset of rheumatoid arthritis. In: *Annals of the Rheumatic Diseases*.
- 147 Rose, N. R.; Bona, C. (1993): Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). In: *Immunol Today* 14 (9), S. 426–430.
- 148 Satoh, M.; Chan, E. K. L.; Ho, L. A.; Rose, K. M.; Parks, C. G.; Cohn, R. D. et al. (2012): Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. In: *Arthritis & Rheumatism* 64 (7), S. 2319–2327.
- 149 Sato, M.; Aoyama, Y.; Kitajima, Y. (2000): Assembly pathway of desmoglein 3 to desmosomes and its perturbation by pemphigus vulgaris-IgG in cultured keratinocytes, as revealed by time-lapsed labeling immunoelectron microscopy. In: *Lab. Invest.* 80 (10), S. 1583–1592.
- 150 Schiltz, J. R.; Michel, B. (1976): Production of epidermal acantholysis in normal human skin in vitro by the IgG fraction from pemphigus serum. In: *J. Invest. Dermatol.* 67 (2), S. 254–260.
- 151 Schiltz, J. R.; Michel, B.; Papay, R. (1978): Pemphigus antibody interaction with human epidermal cells in culture. In: *J. Clin. Invest.* 62 (4), S. 778–788.
- 152 Schmidt, E.; Ambach, A.; Bastian, B.; Bröcker, E. B.; Zillikens, D. (1996): Elevated levels of interleukin-8 in blister fluid of bullous pemphigoid compared with suction blisters of healthy control subjects. In: *J. Am. Acad. Dermatol.* 34 (2 Pt 1), S. 310–312.
- 153 Schmidt, E.; Bastian, B.; Dummer, R.; Tony, H. P.; Bröcker, E. B.; Zillikens, D. (1996): Detection of elevated levels of IL-4, IL-6, and IL-10 in blister fluid of bullous pemphigoid. In: *Arch. Dermatol. Res.* 288 (7), S. 353–357.
- 154 Schmidt, E.; Dähnrich, C.; Rosemann, A.; Probst, C.; Komorowski, L.; Saschenbrecker, S. et al. (2010): Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3: correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients. In: *Experimental Dermatology* 19 (5), S. 458–463.
- 155 Schmidt, E.; Della Torre, R.; Borradori, L. (2011): Clinical Features and Practical Diagnosis of Bullous Pemphigoid. In: *Dermatologic Clinics* 29 (3), S. 427–438.
- 156 Schmidt, E.; Gutberlet, J.; Siegmund, D.; Berg, D.; Wajant, H.; Waschke, J. (2008): Apoptosis is not required for acantholysis in pemphigus vulgaris. In: *AJP: Cell Physiology* 296 (1), S. C162.
- 157 Schmidt, E.; Obe, K.; Brocker, E. B.; Zillikens, D. (2000): Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. In: *Arch Dermatol* 136 (2), S. 174–178.
- 158 Schmidt, E.; Reimer, S.; Kruse, N.; Jainta, S.; Bröcker, E. B.; Marinkovich, M. P. et al. (2000): Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes. In: *J. Invest. Dermatol.* 115 (5), S. 842–848.

- 159 Schmidt, E.; Waschke, J. (2009): Apoptosis in pemphigus. In: *Autoimmunity Reviews* 8 (7), S. 533–537.
- 160 Schmidt, E.; Zillikens, D. (2009): Research in practice: diagnosis of subepidermal autoimmune bullous disorders. In: *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 7 (4), S. 296–300.
- 161 Schmidt, E.; Zillikens, D. (2011): The diagnosis and treatment of autoimmune blistering skin diseases. In: *Dtsch Arztebl Int* 108 (23), S. 399-405, I-III.
- 162 Schmidt, E.; Zillikens, D. (2013): Pemphigoid diseases. In: *The Lancet* 381 (9863), S. 320–332.
- 163 Scott, D. L.; Wolfe, F.; Huizinga, T. W. J. (2010): Rheumatoid arthritis. In: *The Lancet* 376 (9746), S. 1094–1108.
- 164 Sekiguchi, M.; Futei, Y.; Fujii, Y.; Iwasaki, T.; Nishikawa, T.; Amagai, M. (2001): Dominant autoimmune epitopes recognized by pemphigus antibodies map to the N-terminal adhesive region of desmogleins. In: *J Immunol* 167 (9), S. 5439–5448.
- 165 Shikata, K.; Yasuda, T.; Takeuchi, F.; Konishi, T.; Nakata, M.; Mizuochi, T. (1998): Structural changes in the oligosaccharide moiety of human IgG with aging. In: *Glycoconj. J.* 15 (7), S. 683–689.
- 166 Shu, S.; Nisengard, R. J.; Hale, W. L.; Beutner, E. H. (1975): Incidence and titers of antinuclear, antismooth muscle, and other autoantibodies in blood donors. In: *J. Lab. Clin. Med.* 86 (2), S. 259–265.
- 167 Sitaru, C.; Dahnrich, C.; Probst, C.; Komorowski, L.; Blocker, I.; Schmidt, E. et al. (2007): Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies. In: *Exp Dermatol* 16 (9), S. 770–777.
- 168 Sitaru, C.; Goebeler, M.; Zillikens, D. (2004): Bullose Autoimmundermatosen (I): Pathogenese und Diagnostik. In: *J Deut Dermatol Gesell* 2 (2), S. 123–139.
- 169 Sitaru, C.; Schmidt, E.; Petermann, S.; Munteanu, L. S.; Bröcker, E.-B.; Zillikens, D. (2002): Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. In: *J. Invest. Dermatol.* 118 (4), S. 664–671.
- 170 Sitaru, C.; Zillikens, D. (2005): Mechanisms of blister induction by autoantibodies. In: *Exp Dermatol* 14 (12), S. 861–875.
- 171 Skaria, M.; Jaunin, F.; Hunziker, T.; Riou, S.; Schumann, H.; Bruckner-Tuderman, L. et al. (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. In: *J. Invest. Dermatol.* 114 (5), S. 998–1004.
- 172 Somers, E. C.; Thomas, S. L.; Smeeth, L.; Hall, A. J. (2009): Are Individuals With an Autoimmune Disease at Higher Risk of a Second Autoimmune Disorder? In: *American Journal of Epidemiology* 169 (6), S. 749–755.
- 173 Spaeth, S.; Riechers, R.; Borradori, L.; Zillikens, D.; Budinger, L.; Hertl, M. (2001): IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of desmoglein 3 in active pemphigus vulgaris. In: *Br J Dermatol* 144 (6), S. 1183–1188.
- 174 Spindler, V.; Waschke, J. (2011): Role of Rho GTPases in desmosomal adhesion and pemphigus pathogenesis. In: *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 193 (3), S. 177–180.
- 175 Stanley, J. R.; Hawley-Nelson, P.; Yuspa, S. H.; Shevach, E. M.; Katz, S. I. (1981): Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. In: *Cell* 24 (3), S. 897–903.

- 176 Takahashi, Y.; Patel, H. P.; Labib, R. S.; Diaz, L. A.; Anhalt, G. J. (1985): Experimentally induced pemphigus vulgaris in neonatal BALB/c mice: a time-course study of clinical, immunologic, ultrastructural, and cytochemical changes. In: *J. Invest. Dermatol.* 84 (1), S. 41–46.
- 177 Tan, E. M.; Feltkamp, T. E.; Smolen, J. S.; Butcher, B.; Dawkins, R.; Fritzler, M. J. et al. (1997): Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. In: *Arthritis Rheum.* 40 (9), S. 1601–1611.
- 178 Tektonidou, M. G.; Anapliotou, M.; Vlachoyiannopoulos, P.; Moutsopoulos, H. M. (2004): Presence of systemic autoimmune disorders in patients with autoimmune thyroid diseases. In: *Ann Rheum Dis* 63 (9), S. 1159–1161.
- 179 Thornton, B. P.; Vetvicka, V.; Ross, G. D. (1994): Natural antibody and complement-mediated antigen processing and presentation by B lymphocytes. In: *J Immunol* 152 (4), S. 1727–1737.
- 180 Torok, K. S.; Arkachaisri, T. (2010): Autoimmune thyroiditis in antinuclear antibody positive children without rheumatologic disease. In: *Pediatr Rheumatol* 8 (1), S. 15.
- 181 Tsunoda, K.; Ota, T.; Aoki, M.; Yamada, T.; Nagai, T.; Nakagawa, T. et al. (2003): Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. In: *J Immunol* 170 (4), S. 2170–2178.
- 182 Tsunoda, K.; Ota, T.; Suzuki, H.; Ohyama, M.; Nagai, T.; Nishikawa, T. et al. (2002): Pathogenic autoantibody production requires loss of tolerance against desmoglein 3 in both T and B cells in experimental pemphigus vulgaris. In: *Eur. J. Immunol.* 32 (3), S. 627–633.
- 183 Ujiie, H.; Shibaki, A.; Nishie, W.; Sawamura, D.; Wang, G.; Tateishi, Y. et al. (2010): A Novel Active Mouse Model for Bullous Pemphigoid Targeting Humanized Pathogenic Antigen. In: *The Journal of Immunology* 184 (4), S. 2166–2174.
- 184 Ujiie, H.; Shibaki, A.; Nishie, W.; Shinkuma, S.; Moriuchi, R.; Qiao, H.; Shimizu, H. (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. In: *Clinical Immunology* 142 (2), S. 167–175.
- 185 van Beneden, K.; Coppieters, K.; Laroy, W.; Keyser, F. de; Hoffman, I. E.; van den Bosch, F. et al. (2009): Reversible changes in serum immunoglobulin galactosylation during the immune response and treatment of inflammatory autoimmune arthritis. In: *Annals of the Rheumatic Diseases* 68 (8), S. 1360–1365.
- 186 van den Driessche, A.; Eenkhoorn, V.; van Gaal, L.; Block, C. de (2009): Type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome: a clinical review. In: *Neth J Med* 67 (11), S. 376–387.
- 187 Vanderpump, M. P.; Tunbridge, W. M.; French, J. M.; Appleton, D.; Bates, D.; Clark, F. et al. (1995): The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey. In: *Clin Endocrinol (Oxf)* 43 (1), S. 55–68.
- 188 Veldhuizen, I. J. T.; Doggen, C. J. M.; Atsma, F.; Kort, W. L. A. M. de (2009): Donor profiles: demographic factors and their influence on the donor career. In: *Vox Sanguinis* 97 (2), S. 129–138.
- 189 Volken, T.; Weidmann, C.; Bart, T.; Fischer, Y.; Klüter, H.; Rüesch, P. (2013): Individual Characteristics Associated with Blood Donation: A Cross-National Comparison of the German and Swiss Population between 1994 and 2010. In: *Transfus Med Hemother* 40 (2), S. 133–138.
- 190 Walker, D. C.; Kolar, K. A.; Hebert, A. A.; Jordon, R. E. (1995): Neonatal pemphigus foliaceus. In: *Arch Dermatol* 131 (11), S. 1308–1311.

- 191 Wang, J.; Balog, C. I. A.; Stavenhagen, K.; Koeleman, C. A. M.; Scherer, H. U.; Selman, M. H. J. et al. (2011): Fc-Glycosylation of IgG1 is Modulated by B-cell Stimuli. In: *Molecular & Cellular Proteomics* 10 (5), S. M110.004655.
- 192 Wang, X.; Brégégère, F.; Frusić-Zlotkin, M.; Feinmesser, M.; Michel, B.; Milner, Y. (2004): Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins. In: *Apoptosis* 9 (2), S. 131–143.
- 193 Ward, E. S.; Ghetie, V. (1995): The effector functions of immunoglobulins: implications for therapy. In: *The Immunol* 2 (2), S. 77–94.
- 194 Waschke, J. (2008): The desmosome and pemphigus. In: *Histochem Cell Biol* 130 (1), S. 21–54.
- 195 Waschke, J.; Bruggeman, P.; Baumgartner, W.; Zillikens, D.; Drenckhahn, D. (2005): Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. In: *J Clin Invest* 115 (11), S. 3157–3165.
- 196 Waschke, J.; Spindler, V.; Bruggeman, P.; Zillikens, D.; Schmidt, G.; Drenckhahn, D. (2006): Inhibition of Rho A activity causes pemphigus skin blistering. In: *The Journal of Cell Biology* 175 (5), S. 721–727.
- 197 Wijeyesinghe, U.; Russell, A. S. (2008): Outcome of high titer antinuclear antibody positivity in individuals without connective tissue disease: a 10-year follow-up. In: *Clin Rheumatol* 27 (11), S. 1399–1402.
- 198 Wilgrim, G. F.; Caufield, J. B.; Lever, W. F. (1961): An electron microscopic study of acantholysis in pemphigus vulgaris. In: *J. Invest. Dermatol.* 36, S. 373–382.
- 199 Williamson, L.; Raess, N. A.; Caldelari, R.; Zakher, A.; Bruin, A. de; Posthaus, H. et al. (2006): Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin. In: *EMBO J.* 25 (14), S. 3298–3309.
- 200 Witebsky, E.; Rose, N. R.; Terplan, K.; Paine, J. R.; Egan, R. W. (1957): Chronic thyroiditis and autoimmunization. In: *J Am Med Assoc* 164 (13), S. 1439–1447.
- 201 Yamamoto, Y.; Aoyama, Y.; Shu, E.; Tsunoda, K.; Amagai, M.; Kitajima, Y. (2007): Anti-desmoglein 3 (Dsg3) monoclonal antibodies deplete desmosomes of Dsg3 and differ in their Dsg3-depleting activities related to pathogenicity. In: *J. Biol. Chem.* 282 (24), S. 17866–17876.
- 202 Yoshida, M.; Hamada, T.; Amagai, M.; Hashimoto, K.; Uehara, R.; Yamaguchi, K. et al. (2006): Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. In: *J Dermatol Sci* 41 (1), S. 21–30.
- 203 Yuen, K. L.; Yau, K. C. (2012): An old gentleman with vegetative plaques and erosions: a case of pemphigus vegetans. In: *Hong Kong J. Dermatol. Venereol.* 2012 (20), S. 179–182.
- 204 Yu, X.; Holdorf, K.; Kasper, B.; Zillikens, D.; Ludwig, R. J.; Petersen, F. (2010): FcγRIIA and FcγRIIIB are required for autoantibody-induced tissue damage in experimental human models of bullous pemphigoid. In: *J. Invest. Dermatol.* 130 (12), S. 2841–2844.
- 205 Zhao, Y.; Li, J.; Li, X. X.; Li, C.; Li, L.; Li, Z. G. (2009): What can we learn from the presence of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in systemic lupus erythematosus? In: *Joint Bone Spine* 76 (5), S. 501–507.
- 206 Zillikens, D.; Giudice, G. J. (1999): BP180/type XVII collagen: its role in acquired and inherited disorders or the dermal-epidermal junction. In: *Arch Dermatol Res* 291 (4), S. 187–194.

- 207 Zillikens, D.; Mascaro, J. M.; Rose, P. A.; Liu, Z.; Ewing, S. M.; Caux, F. et al. (1997): A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. In: *J Invest Dermatol* 109 (5), S. 679–683.
- 208 Zillikens, D.; Rose, P. A.; Balding, S. D.; Liu, Z.; Olague-Marchan, M.; Diaz, L. A.; Giudice, G. J. (1997): Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. In: *J. Invest. Dermatol.* 109 (4), S. 573–579.
- 209 Zillikens, D.; Wever, S.; Roth, A.; Weidenthaler-Barth, B.; Hashimoto, T.; Bröcker, E. B. (1995): Incidence of autoimmune subepidermal blistering dermatoses in a region of central Germany. In: *Arch Dermatol* 131 (8), S. 957–958.
- 210 Zone, J. J.; Taylor, T.; Hull, C.; Schmidt, L.; Meyer, L. (2007): IgE basement membrane zone antibodies induce eosinophil infiltration and histological blisters in engrafted human skin on SCID mice. In: *J Invest Dermatol* 127 (5), S. 1167–1174.
- 211 <http://www.immunfluoreszenz.de/> (Tag des Abrufs: 19.07.2013).
- 212 <http://www.euroimmun.de/index.php?id=techniken&L=0> (Tag des Abrufs: 03.05.2014).

7 Anhang

7.1 Votum der Ethikkommission

Alle hier durchgeführten Untersuchungen der Blutproben gesunder Blutspender sind durch die zuständige Ethikkommission bewilligt worden: Aktenzeichen 10-094, Genehmigungsschreiben vom 01.06.2010.

7.2 Ergänzende Abbildungen

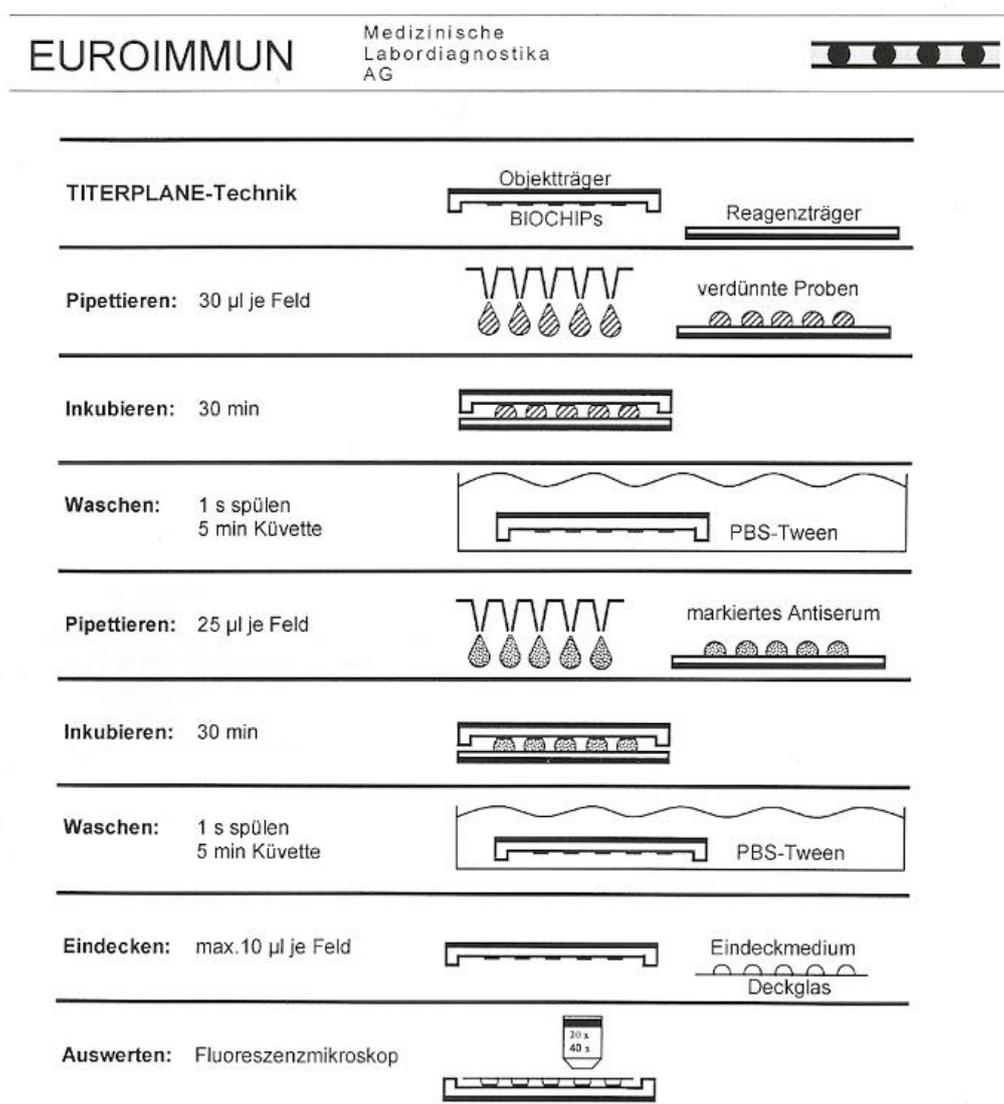


Abbildung 7.1: Standardprotokoll des Biochip basierten Indirekten Immunfluoreszenz Assay.

Dieses Verfahren wurde für die Bestimmung der Autoantikörper gegen Hautstrukturproteine und endokrine Organe verwendet. Die Titerplane Technik ermöglicht den gleichzeitigen Inkubationsstart aller Proben und verhindert die Verdunstung der Flüssigkeiten.

EUROIMMUN		Medizinische Labordiagnostika AG	
(EV_0010_F_DEUK_A04) EV_0010_F_DEUK_A04_13351000-0092-03 doc			
ELISA-Inkubation ELISA Incubation			
		Antigen-beschichtete Reagenzgefäße <i>antigen-coated wells</i>	
Pipettieren: Pipette:	100 µl je Reagenzgefäß 100 µl per well	Kalibratoren, Kontrollen, verdünnte Proben <i>calibrators, controls, samples</i>	
1.	Inkubieren: Incubate:	30 min bei Raumtemperatur (18°C bis 25°C) 30 min at room temperature (18°C to 25°C)	
Waschen: Wash:	300 µl (man.)/450 µl (aut.) je Reagenzgefäß Einwirkzeit: 30-60 s je Waschzyklus 300 µl (man.)/450 µl (aut.) per well reaction time: 30-60 s per washing cycle		3X 
Pipettieren: Pipette:	100 µl je Reagenzgefäß 100 µl per well	Enzymkonjugat <i>enzyme conjugate</i>	
2.	Inkubieren: Incubate:	30 min bei Raumtemperatur (18°C bis 25°C) 30 min at room temperature (18°C to 25°C)	
Waschen: Wash:	300 µl (man.)/450 µl (aut.) je Reagenzgefäß Einwirkzeit: 30-60 s je Waschzyklus 300 µl (man.)/450 µl (aut.) per well reaction time: 30-60 s per washing cycle		3X 
Pipettieren: Pipette:	100 µl je Reagenzgefäß 100 µl per well	Chromogen/Substrat <i>chromogen/substrate</i>	
3.	Inkubieren: Incubate:	15 min bei Raumtemperatur (18°C- 25°C) 15 min at room temperature (18°C- 25°C)	
Pipettieren: Pipette:	100 µl je Reagenzgefäß 100 µl per well	Stopplösung <i>stop solution</i>	
Auswerten: Evaluate:	Photometrische Messung (450 nm) photometric measurement (450 nm)		

Abbildung 7.2: Standardprotokoll der ELISA Assays.

Dieses Verfahren wurde für die Validierung der IIF positiven Anti-BP180, Anti-BP230, Anti-Dsg1 und Anti-Dsg3 Plasmaproben verwendet. Zudem wurden Autoantikörper gegen CCP mittels ELISA bestimmt. Hierbei wurde jedoch der erste Inkubationsschritt für 60 min, der zweite und dritte Inkubationsschritt für 30 min durchgeführt.

7.3 Ausschlusskriterien für Blutspender

Auszug aus der Zweiten Richtlinienanpassung 2010 zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) nach §§ 12 a und 18 TFG; Seite 23 bis Seite 27 [38]

Ausschluss von der Blutspende

Vor jeder Spende ist zu prüfen, ob eines der nachfolgenden Ausschlusskriterien vorliegt.

Kriterien für einen Dauerausschluss

Personen, die an

- schweren neurologischen Erkrankungen,
- schweren Herz- und Gefäßkrankheiten,
- anderen chronischen Krankheiten, bei denen die Blutspende eine Gefährdung des Spenders oder des Empfängers nach sich ziehen kann, oder
- bösartigen Neoplasien (Ausnahmen: in situ Karzinom und Basalzellkarzinom nach kompletter Entfernung) leiden oder litten, ´
- einer Allergie leiden, wobei die Entscheidung im Einzelfall beim Arzt liegt.

Personen, bei denen eine der folgenden Infektionen nachgewiesen wurde:

- HIV-1 oder HIV-2,
- HBV (Ausnahme: die Infektion bzw. Erkrankung liegt mehr als 5 Jahre zurück und virologische Kriterien – z. B. Nachweis von Anti-HBs mit einem Titer von 100 U/l und negatives Ergebnis eines Tests auf HBV-Genom mittels einer validierten, empfindlichen Nukleinsäure-Amplifikationstechnik – sprechen für eine erloschene Kontagiosität),
- HCV,
- HTLV Typ 1 oder Typ 2 (HTLV-1/-2),
- Protozoosen: Babesiose, Trypanosomiasis (z. B. Chagas-Krankheit), Leishmaniose,
- Syphilis,
- andere chronisch persistierende bakterielle Infektionen¹², wie Brucellose, Fleckfieber und andere Rickettsiosen, Lepra, Rückfallfieber, Melioidose oder Tularämie.

Personen mit dem Risiko der Übertragung spongiformer Enzephalopathien (TSE):

- nach Behandlung mit aus menschlichen Hypophysen gewonnenen Hormonen,
- nach Erhalt von Dura-mater- bzw. Korneatransplantaten,
- bei nachgewiesener oder einem Verdacht auf TSE (Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit oder andere TSE),
- wegen eines familiären Risikos, eine TSE zu entwickeln (bekannte Creutzfeldt-Jakob-Krankheit oder eine andere TSE bei einem oder mehreren Blutsverwandten),
- nach einem Aufenthalt im Vereinigten Königreich Großbritannien und Nordirland von insgesamt mehr als 6 Monaten in den Jahren 1980–1996,

- nach einer Operation und/oder Transfusionen (Blutkomponenten) im Vereinigten Königreich Großbritannien und Nordirland nach dem 01.01.198013,

Empfänger von Xenotransplantaten.

Personen, die Drogen konsumieren und Medikamente missbräuchlich zu sich nehmen:

- Alkoholranke,
- Personen, die medikamenten- oder rauschgiftabhängig sind oder bei denen ein begründeter Verdacht dessen besteht,
- Personen, die Medikamente missbräuchlich verwenden,

Personen, deren Sexualverhalten ein gegenüber der Allgemeinbevölkerung deutlich erhöhtes Übertragungsrisiko für durch Blut übertragbare schwere Infektionskrankheiten, wie HBV, HCV oder HIV bergen:

- heterosexuelle Personen mit sexuellem Risikoverhalten, z. B. Geschlechtsverkehr mit häufig wechselnden Partnern,
- Männer, die Sexualverkehr mit Männern haben (MSM),
- männliche und weibliche Prostituierte.

Zeitlich begrenzte Rückstellungskriterien

Infektionen

nach medizinisch dokumentierter Heilung von Malaria für **4 Jahre**,

nach medizinisch dokumentierter Heilung von Osteomyelitis, Q-Fieber, Tuberkulose sowie Infektionen mit Salmonella typhi und paratyphi für **2 Jahre**,

nach Abklingen der Symptome einer Toxoplasmose für **6 Monate**,

nach Abschluss der Behandlung eines rheumatischen Fiebers für **2 Jahre**,

nach einer Hepatitis A bzw. dem Nachweis einer HAV-Infektion (IgM-AK) für **4 Monate**,

nach fieberhaften Erkrankungen und/oder Durchfallerkrankungen unklarer Ursache für **4 Wochen**,

nach Abklingen der Symptome anderer als der oben erwähnten Infektionskrankheiten (mit Ausnahme unkomplizierter Infekte) für mindestens **4 Wochen**,

nach einem unkomplizierten Infekt für **1 Woche**.

Exposition mit dem Risiko, eine übertragbare Infektion zu erwerben

Personen, die in einem Malaria-Endemiegebiet geboren oder aufgewachsen sind oder die sich kontinuierlich über mehr als 6 Monate in einem Malaria-Endemiegebiet aufgehalten hatten für **4 Jahre** nach Verlassen der Endemieregion; vor Aufnahme der Spendetätigkeit muss durch eine gezielte Anamnese, klinische Untersuchung und durch eine validierte

und qualitätsgesicherte Labordiagnostik festgestellt werden, dass kein Anhalt für Infektiosität besteht.

nach Besuch eines Malaria-Endemiegebietes für mindestens **6 Monate**,

Personen, die aus einem Gebiet eingereist sind, in dem sie sich kontinuierlich länger als 6 Monate aufgehalten haben, und in dem sich HBV-, HCV-, HIV- oder HTLV-1/-2-Infektionen vergleichsweise stark ausgebreitet haben für **4 Monate** nach dem letzten Aufenthalt; Zulassung zur Spende im Falle kürzerer Aufenthalte kann nach ärztlicher Beurteilung erfolgen,

nach intimmem Kontakt mit Personen, die einer Gruppe mit erhöhtem Infektionsrisiko für HBV, HCV und/oder HIV angehören (s. *oben*) für **4 Monate**,

während der Haft und nach Haftentlassung für **4 Monate**,

bei engen Kontakten innerhalb einer häuslichen Lebensgemeinschaft mit dem Risiko einer Infektion durch Hepatitis (HBV, HCV, HAV) für **4 Monate** nach letztem Kontakt,

nach halogenen Gewebetransplantaten (Dura-mater- und Korneatransplantate s. Abschn. 2.2.1) und nach großen Operationen für **4 Monate**,

nach anderen Operationen im Ermessen des Arztes,

nach Endoskopien/Biopsien/Katheteranwendungen mit Ausnahme von Einmalkathetern für **4 Monate**,

nach Empfang von autologen und allogenen Blutkomponenten oder Plasmaderivaten (ausgenommen Humanalbumin) für **4 Monate**,

nach invasiver Exposition, auch Schleimhautkontakt, gegenüber Blut bzw. Verletzungen mit durch Blut kontaminierten Injektionsnadeln oder Instrumenten für **4 Monate**,

nach einer Akupunktur, falls diese nicht unter aseptischen Bedingungen mit Einmalnadeln durchgeführt wurde, für **4 Monate**,

nach Tätowierungen oder Durchbohrungen der Haut und Schleimhaut zur Befestigung von Schmuck für **4 Monate**,

nach einem kleinen operativen Eingriff oder einer Zahnextraktion für **1 Woche**,

nach zahnärztlicher Behandlung für **1 Tag**.

Impfungen

nach Verabreichung von Lebendimpfstoffen (z. B. gegen Gelbfieber, Röteln, Masern, Mumps, Typhus, Cholera) für **4 Wochen**,

nach Impfung gegen Tollwut bei Verdacht auf Exposition für **12 Monate**,

nach Hepatitis-B-Impfung für **1 Woche**.

Keine Rückstellung ist erforderlich nach Applikation von Tot- bzw. Toxoidimpfstoffen oder gentechnisch hergestellten Impfstoffen (z. B. Poliomyelitis inaktiviert, Typhus inaktiviert, Diphtherie, Influenza, Cholera inaktiviert, Tetanus, FSME, Hepatitis A), sofern der Spender ohne klinische Symptome und bei Wohlbefinden ist.

Rückstellung wegen besonderer epidemiologischer Situationen

Rückstellung bei besonderen epidemiologischen Situationen angepasst an die entsprechende Situation,

nach Verlassen eines Gebietes mit saisonal fortlaufender Übertragung des Westnil-Virus auf Menschen für **4 Wochen**, sofern keine Genomtestung durchgeführt wird.

Sonstige Rückstellgründe

nach Verabreichung von Sera tierischen Ursprungs für **12 Monate**,

während und 6 Monate nach Schwangerschaft bzw. bis zum Abstillen,

Rückstellung nach Medikamenteneinnahme in Abhängigkeit von der Pharmakokinetik und der Indikation des angewendeten Medikaments.

Danksagung

Von der Planung bis zur Fertigstellung dieser Arbeit haben mich viele Menschen unterstützt, denen ich hiermit danken möchte.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Detlef Zillikens, Direktor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck, für die Bereitstellung der Forschungslabore vielmehr jedoch für die stete wissenschaftliche Förderung und alle Möglichkeiten, die nun vor mir liegen.

Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ludwig gilt mein herzlichster Dank für die Überlassung des Themas, die allzeit mögliche fachliche Beratung und die Anregung der Bewerbung für das Stipendium des Graduiertenkollegs 1727. Durch seine Bürotür zu treten und Ideen auszutauschen, war mit stets eine große Freude.

Herrn Prof. Dr. med. Saleh Ibrahim gilt mein Dank für die Begleitung als Mentor. Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Kutane Autoimmunität und des Graduiertenkollegs 1727 für die angenehme Arbeitsatmosphäre, lehrreiche Forschungserfahrungen und Unterstützung der experimentellen Durchführung der Arbeit bedanken. Hier möchte ich insbesondere Frau Dipl. biol. Susen Müller, Frau Rebecca Cames, Frau Claudia Cauderer und Frau Miriam Freitag hervorheben. Vielen Dank an Herrn Dr. med. Andreas Recke und Herrn Dr. rer. nat. Steffen Möller für die Unterstützung bei statistischen Fragestellungen und Auswertungen.

Herrn Prof. Dr. med. Winfried Stöcker möchte ich für die Förderung des Projektes durch die Euroimmun AG und die leckere Verköstigung danken. Desweiteren danke ich Frau Dr. Kristin Rentzsch, Frau Sonja Oberbeck und Frau Manja Kowalke für die Anleitung und Unterstützung der Experimente, die in den Laboren von Euroimmun durchgeführt wurden.

Mein tiefster Dank gilt meinen Eltern für ihre Liebe und unablässige Unterstützung. Ihrem Arbeitsfleiß und Ehrgeiz kann ich nur versuchen nachzueifern. Meinem Bruder danke ich für seine erfrischende Heiterkeit.

Herzlichen Dank möchte ich meinen Schwiegereltern für die warmherzige Begleitung aussprechen.

Liebsten Dank meinem Mann für die gegenseitige Unterstützung. Welch Ansporn und Glück bringt er mir.

Lebenslauf

Persönliche Angaben: Wiebke Prüßmann, geb. Jung
geboren am 04.06.1988 in Erfurt, Thüringen

Schulabschluss: 2006 Abitur; Note sehr gut 1,0

Hochschulstudium:

10/2007 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
04/2009 - 07/2009 Wahlfach „Anatomie des Immunsystems“ bei Prof. Dr. med. Jürgen Westermann
09/2009 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung; Note sehr gut 1,5
04/2011 - 03/2012 Promotionssemester
10/2012 - 02/2013 Wahlfach „Klinische Rheumatologie“ bei Prof. Dr. med. Peter Lamprecht
11/2014 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung; Note sehr gut 1,5

Praktisches Jahr:

08/2013 - 12/2014 Institut für Pathologie, UKSH Campus Lübeck, Lübeck
12/2013 - 03/2014 Klinik für Innere Medizin, Sophien- und Hufeland Klinikum, Weimar
03/2014 - 07/2014 Klinik für Chirurgie, UKSH Campus Lübeck, Lübeck

Promotion:

07/2010 Beginn der Promotion unter Prof. Dr. med. Ralf Ludwig, AG Kutane Autoimmunität, Klinik für Dermatologie, Universität zu Lübeck
08/2010 - 12/2012 Durchführung der Experimente
04/2011 - 03/2012 Stipendium des Graduiertenkollegs 1727 „Autoimmunität“ für Medizinstudenten, Medical Doctor Teilprojekt 4
12/2014 Fertigstellung der Arbeit

Auslandserfahrung:

07/2006 - 07/2007 Auslandspraktikum als Research Assistent in der Childhood Allergy and Immunology Research Group, School of Paediatrics, Department of Dentistry and Medicine, University of Western Australia, Perth
08/2011 Famulatur in der Paediatric Oncology, School of Paediatrics, Department of Dentistry and Medicine, University of Western Australia, Perth

Veröffentlichungen

1. Prüßmann J*, **Prüßmann W***, Recke A, Rentzsch K, Juhl D, Henschler R, Müller S, Lamprecht P, Schmidt E, Csernok E, Görg S, Stöcker W, Zillikens D, Ibrahim SM, Ludwig RJ. Co-occurrence of autoantibodies in healthy blood donors. **Exp Dermatol. 2014.** *equal contributors
2. **Prüßmann W***, Prüßmann J*, Koga H*, Recke A, Iwata H, Juhl D, Görg S, Henschler R, Hashimoto T, Schmidt E, Zillikens D, Ibrahim SM and Ludwig RJ. Prevalence of pemphigus and pemphigoid autoantibodies in the general population. In submission. *equal contributors

Kongressbeiträge

1. Prüßmann J*, **Jung W***, Recke A, Rentzsch K, Juhl D, Henschler R, Müller S, Lamprecht P, Schmidt E, Csernok E, Görg S, Stöcker W, Zillikens D, Ibrahim SM and Ludwig RJ. Prevalence and co-occurrence of autoantibodies in healthy blood donors. Poster Presentation. International Meeting on Autoimmune Bullous Diseases, Lübeck. 2013. *equal contributors
2. **Jung W***, Prüßmann J*, Recke A, Stöcker W, Juhl D, Henschler R, Görg S, Zillikens D, Ibrahim SM, Schmidt E and Ludwig RJ. Prevalence of pemphigus and pemphigoid autoantibodies in the general population. Poster Presentation. International Investigative Dermatology, Edinburgh. 2013. *equal contributors
3. Prüßmann J*, **Jung W***. Incidence and Clustering of Autoantibodies in Blood Donors. Oral Presentation. Symposium of the North German Immunologists, Borstel. 2012. *equal contributors