

**Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie
der Universität zu Lübeck**

Direktorin: Prof. Dr. med. Evelyn Gaffal

**Experimentelle Untersuchungen zur vermuteten Rolle der
Dipeptidyl-Peptidase-IV Inhibitoren als Auslöser akuter
Krankheitsausbrüche des bullösen Pemphigoids**

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

vorgelegt von
Iosifina Doxastaki
aus Heraklion / Griechenland

Lübeck 2025

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Sadik

2. Berichterstatterin: PD Dr. med. Julianna Knief

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 01.07.2025

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
1.1 <i>Dipeptidylpeptidase-IV.....</i>	7
1.2 <i>Dipeptidylpeptidase-IV Inhibitoren</i>	8
1.2.1 <i>Dipeptidylpeptidase-IV Inhibitoren und Haut.....</i>	9
1.3 <i>Registerstudien zum BP unter DPP-IV Inhibition.....</i>	11
1.4 <i>Fallberichte zum BP unter DPP-IV Inhibition.....</i>	14
1.5 <i>Blasenbildende Autoimmunerkrankungen</i>	17
1.6 <i>Bullöse Pemphigoid und Epidermolysis bullosa acquisita.....</i>	18
1.6.1 <i>Epidemiologie und Risikofaktoren</i>	18
1.6.2 <i>Klinik.....</i>	19
1.6.3 <i>Verlauf und Prognose</i>	23
1.6.4 <i>Pathogenese</i>	23
1.6.5 <i>Diagnostik</i>	32
1.6.6 <i>Therapie.....</i>	37
1.7 <i>Ziele dieser Studie</i>	41
2. Material und Methoden	43
2.1. <i>Gefrierschnittmodell</i>	43
2.1.1. <i>Leukozytenisolierung</i>	44
2.1.2. <i>Vorbereitung der DPP-IV Inhibitoren</i>	45
2.1.3. <i>Vorbereitung der Gefrierschnitte.....</i>	46
2.1.4. <i>Färbung der Schnitte.....</i>	46
2.2. <i>ROS-Release</i>	48
2.2.1. <i>Isolierung von neutrophilen Granulozyten</i>	48
2.2.2. <i>Vorbereitung von DPP-IV Inhibitoren und DMSO</i>	49
2.2.3. <i>Durchführung des ROS-Release</i>	50
2.3. <i>PMNs Stimulation</i>	51
2.4. <i>Durchflusszytometrie</i>	52
2.4.1. <i>Durchführung der Durchflusszytometrie</i>	52
2.5. <i>ELISA für IL8 und IL6.....</i>	52
2.5.1. <i>Durchführung des ELISA.....</i>	53
2.6. <i>Quantitative PCR</i>	55
2.6.1. <i>RNA-Isolation</i>	55
2.6.2. <i>cDNA Synthese</i>	56
2.6.3. <i>qPCR</i>	56
2.7. <i>Autoantikörpertransfer Mausmodell der EBA.....</i>	58
2.7.1. <i>IgG-Reinigung und Isolierung von spezifischem mCol 7c IgG.....</i>	58
2.7.2. <i>Durchführung des EBA Mausversuches</i>	60
2.7.3. <i>Direkte Immunfluoreszenz</i>	61
2.8. <i>Auswertung</i>	62
3. Ergebnisse	63
3.1. <i>Effekte von DPP-IV Inhibitoren auf die Bildung von ROS im Gefrierschnittmodell</i>	63
3.2. <i>Effekte von DPP-IV Inhibitoren auf die Bildung von ROS im ROS-Release</i>	65
3.3. <i>Wirkung der DPP-IV Inhibitoren auf das Überleben der Zellen</i>	68

3.4. Effekte von DPP-IV Inhibitoren zur IL8 Freigabe von PMNS durch ELISA.....	69
3.5. Effekte von DPP-IV Inhibitoren zur IL6 Freigabe von PMNs durch ELISA	71
3.6. Effekte von DPP-IV Inhibitoren zur IL8 Freisetzung mittels quantitative PCR.....	73
3.7. Effekte von DPP-IV Inhibitoren bei EBA Mausversuch	75
4. Diskussion	78
4.1. Das Gefrierschnittmodell.....	79
4.2. Effekte von DPP-IV Inhibitoren auf das Überleben der Zellen	82
4.3. Effekte von DPP-IV Inhibitoren auf die Bildung von ROS, ELISA und mittels quantitative PCR.....	83
4.4. Die Effekte der DPP-IV Inhibitoren bei passivem Mausmodell der EBA.....	90
4.5 Ausblick	93
5. Zusammenfassung	96
6. Literaturverzeichnis	98
7. Anhang	129
8. Danksagung	131

Abkürzungsverzeichnis

AA	- Aminosäuren
AMPK	- AMP-aktivierte Proteinkinase
BP	- bullöses Pemphigoid
DES	- dermo-epidermale Spaltbildung
DEJ	- dermo-epidermale Junktionszone
DEPC	- Diethylpyrocarbonat
DMSO	- Dimethylsulfoxid
DPP-IV	- Dipeptidyl-peptidase-IV
DPP-IV Inhibitoren	- Dipeptidyl-peptidase-IV Inhibitoren
Dsc	- Desmocollin
Dsg	- Desmoglein
EBA	- Epidermolysis bullosa acquisita
ER	- Endoplasmatische Retikulum
ELISA	- Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	- Fluorescence-activated cell sorting
GAPDH	- Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSH-Px	- Glutathione peroxidase
H-E-Färbung	- Färbung mit Hämatoxylin und Eosin
HLA	- Humane Leukozytenantigenen
i.p.	- intraperitoneal
i.v.	- intravenös
LPS	- Lipopolysaccharide
MMP 9	- Matrix-Metalloproteinase 9
OD	- optische Dichte
PBMC	- mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	- Phosphate-buffered saline
PI	- Propidium Iodide
PMNS	- polymorphkernige Leukozyten
p.o.	- peroral
rh DPP-IV	- rekombinantes humanes DPP-IV

ROS	- reactive oxygen species (reactive Sauerstoffspezies)
RPMI	- Roswell Park Memorial Institute medium
SEM	- Mittelwerte \pm Standardabweichung
Sirt1	- Sirtuin-1
SOD	- Superoxide-Dismutase
UAW	- Unerwünschte Arzneimittelwirkungen

1 Einleitung

1.1 Dipeptidylpeptidase-IV

Die Dipeptidylpeptidase-IV (DPP-IV) wurde erstmals 1966 beschrieben. Die DPP-IV ist ein homodimeres Typ-II transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 220-240 kDa und ist identisch mit dem Leukozyten-Oberflächenantigen CD26. Menschliches CD26 wird von 766 Aminosäuren gebildet, einschließlich einer kurzen zytoplasmatischen Domäne von 6 Aminosäuren, einer Transmembranregion von 23 Aminosäuren und einer extrazellulären Domäne (siehe Abb. 1). Diese extrazelluläre Domäne der DPP-IV ist für die enzymatische Aktivität dieses Transmembranproteins als Dipeptidylpeptidase verantwortlich und kann als solche selektiv das N-terminale Dipeptid aus Peptiden mit Prolin oder Alanin an der vorletzten Position entfernen (Ohnuma et al. 2008).

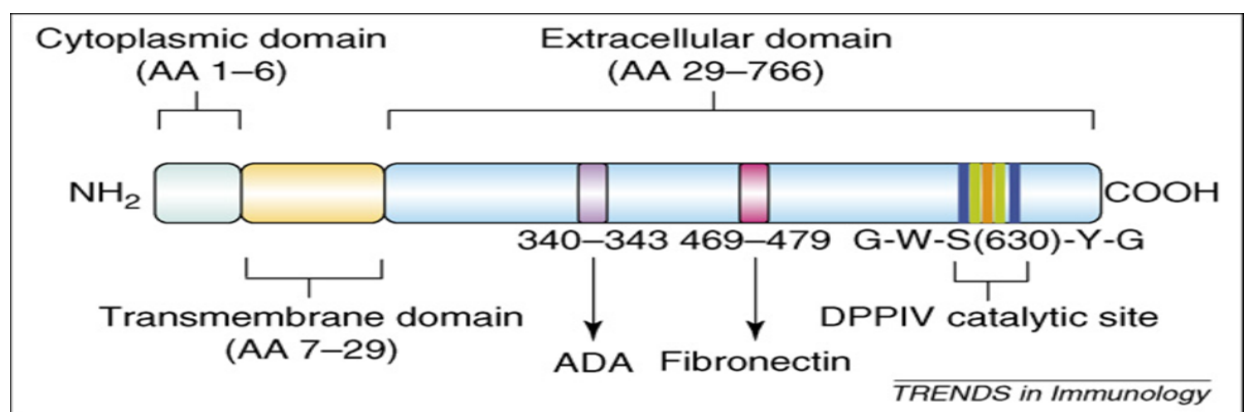


Abbildung 1: Schematische Darstellung des menschlichen CD26/DPP-IV Moleküls. Menschliche CD26/DPP-IV ist ein Typ II transmembranes Glycoprotein, das aus 766 Aminosäuren (AA) zusammengesetzt und an die Lipiddoppelschicht durch ein einziges hydrophobes Segment an den Resten 7-29 verankert ist. Es gibt einen kurzen cytoplasmatischen Bereich, der aus den N-terminalen Aminosäuren 1-6 gebildet wird. Die extrazelluläre Region umfasst die Membrananker an glykosylierten Resten, eine Adenosin-Deaminase-bindende Domäne (AA 340-343), Fibronectin-bindende Reste (AA 469-479) sowie einen C-terminalen katalytischen Bereich. Dieser katalytische Bereich wird von Glycin - Tryptophan – Serin (AA 630) - Tyrosine - Glycin und der linearen Ordnung der Nukleophilie (Serin (630) – Asparaginsäure (705) – Histidin (740)) umgeben. Quelle: Ohnuma et al. 2008.

1.2 Dipeptidylpeptidase-IV Inhibitoren

Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase-IV (auch als DPP-IV Inhibitoren oder Gliptine bezeichnet) stellen eine Wirkstoffklasse unter den Antidiabetika dar, die für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 benutzt wird. Die Substanzen der DPP-IV Inhibitoren wirken durch das Enzym Dipeptidylpeptidase-IV, welches den Abbau des Hormons Glucagon hemmt.

Im Detail ist DPP-IV eine homodimere, Prolyloligopeptidase, die es nicht nur als Membranverankerte Zelloberflächen-Peptidase gibt, sondern auch als kleinere lösliche Form zirkuliert. DPP-IV Inhibitoren wirken hauptsächlich durch das Inkretin-Hormon GLP-1. GLP-1, welches vom DPP-IV Enzym abgebaut wird, wird im oberen Dünndarm, im distalen Ileum und im Kolon mit der Nahrung ausgeschieden. Infolge der GLP-1-Produktion wird die Insulinsekretion der Beta-Zellen des Pankreas gesteigert und die Glukagonsekretion der Alpha-Zellen des Pankreas verringert (Filippatos et al. 2014).

DPP-IV wird bei Epithelzellen, Kapillarendothelzellen und Lymphozyten exprimiert. Dieses Molekül befindet sich auch im Magendarmtrakt, im exokrinen Pankreas (Azinuszellen), in der Leber, den Gallenwegen, der Milz, den Lymphknoten, der Lungen, den Nieren und Nebennieren, der Gebärmutter, Plazenta, Prostata, Thymusdrüse, den Schweiß- und Brustdrüsen und dem Gehirn. Das breite Expressionsmuster der DPP-IV steht im Zusammenhang mit unterschiedlichen physiologischen Funktionen, die sowohl die enzymatische Aktivität der Inkretin-Degradierung, der Immunaktivitäten und der Hormonaktivitäten, als auch eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion und der Hemmung von Krebswachstum umfassen (Filippatos et al. 2014).

DPP-IV gehört zu einer großen Gruppe aus strukturell verwandten Prolylendopeptidasen. Das Substrat des DPP-IV enthält zahlreiche Neuropeptide, Hormone und Chemokine, wie zum Beispiel DPP-8, DPP-9 Moleküle und CXC-Motiv-Chemokin 12 (SDF-1 α und SDF-1 β). DPP-8 und DPP-9 Moleküle sind intrazellulär lokalisiert und teilen sich eine Sequenzhomologie von 26% mit der DPP-IV. DPP-8 und DPP-9 Moleküle konnten bisher in der Skelettmuskulatur, dem Herz und der Leber nachgewiesen werden. Diese Moleküle spielen auch eine Rolle in der Aktivierung von T-Zellen und in der Funktion des Immunsystems. Es wurde auch beobachtet, dass die Hemmung des DPP-8 und des DPP-9 durch die DPP-IV Inhibitoren mit bestimmten Nebenwirkungen verbunden sein könnte, wie zum Beispiel Hautdefekten und Störungen des Immunsystems (Filippatos et al. 2014, Stulc and Sedo 2010).

Die Gruppe der DPP-IV Inhibitoren enthält hauptsächlich die folgenden Wirkstoffe: Sitagliptin, Vildagliptin, Saxagliptin, Alogliptin, Linagliptin, Anagliptin, Teneligliptin und Gemigliptin. Die DPP-IV Inhibitoren können aufgrund ihrer Struktur in zwei Kategorien eingeteilt werden: einerseits die DPP-IV Inhibitoren, die die Struktur von DPP-IV Substraten nachahmen und andererseits die Gliptine, die nicht als Peptidomimetische bezeichnet werden (siehe Abb. 2).

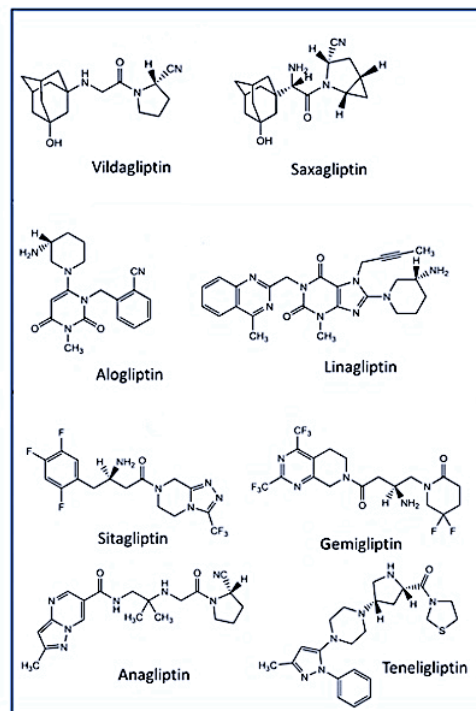


Abbildung 2: Die Struktur der Dipeptidylpeptidase-IV Inhibitoren. Quelle: Filipatos et al. 2014

1.2.1 Dipeptidylpeptidase-IV Inhibitoren und Haut

Dipeptidylpeptidase IV (DPP-IV) ist ein Membranprotease – Enzym, das in verschiedenen Geweben und Zellen exprimiert wird, einschließlich Keratinozyten. DPP-IV wird auch als CD26 bezeichnet und ist ein Zelloberflächenmolekül, das an der Regulation des Immunsystems und der Signalübertragung beteiligt ist (Yang et al. 2014).

Die Expression von DPP-IV in Keratinozyten wurde in mehreren Studien untersucht. Eine Studie von 2014 zeigte, dass DPP-IV in normalen menschlichen Epidermiszellen, einschließlich Keratinozyten, exprimiert wird. Die Expression von DPP-IV war höher in der Basalschicht der Epidermis und nahm mit der Differenzierung der Keratinozyten ab (Hwang et al. 2014).

In einer anderen Studie von 2019 wurde die Expression von DPP-IV in Hautläsionen von Patienten mit Psoriasis untersucht. Die Autoren fanden heraus, dass die Expression von DPP-IV in den betroffenen Hautläsionen von Patienten mit Psoriasis im Vergleich zu gesunder Haut signifikant erhöht war. Dies deutete darauf hin, dass DPP-IV eine Rolle bei der Pathogenese von Psoriasis spielen könnte (Kim et al. 2019).

Insgesamt scheint DPP-IV in normalen und krankhaften Hautgeweben, einschließlich Keratinozyten, exprimiert zu werden. Die Sekretion des DPP-IV-Enzyms von den verschiedenen Zelltypen kann zur Cytokin-Produktion, Gewebedifferenzierung und zum Kollagenstoffwechsel beitragen (Thielitz et al. 2008).

Außerdem sind Proglucagon, GLP-1- und GIP-Rezeptoren in Hautstruktur beschrieben worden (List et al. 2006, Skandalis et al. 2012).

Nach der aktuellen Literatur sind sowohl Fälle mit Hautausschlag und Pruritus als auch Fälle mit Überempfindlichkeitsreaktionen der Haut und Stevens-Johnson-Syndrom beschrieben worden (Mas-Vidal et al. 2012, Tanaka et al. 2012).

Außer dem DPP-IV-Enzym werden auch die DPP-8 und DPP-9 Moleküle auf der Oberfläche von den Hautzellen exprimiert. Das könnte auch bei den beobachteten Hautreaktionen mit den DPP-4-Inhibitoren eine Rolle spielen (Kania et al. 2011).

Des Weiteren existieren Fallberichte, in welchen die Entwicklung eines bullösen Pemphigoid (BP) nach der Verabreichung von den DPP-IV Inhibitoren für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 beschrieben wurde und einen Zusammenhang zwischen den DPP-IV Inhibitoren und des BPs nahelegen. Interessanterweise konnte meistens eine komplette Remission nach dem Absetzen der verdächtigen Medikamente beobachtet werden. Deswegen werden die DPP-IV Inhibitoren mit der Entwicklung des BP korreliert (Attaway et al. 2014).

1.3 Registerstudien zum BP unter DPP-IV Inhibition

Das bullöse Pemphigoid (BP) ist die häufigste blasenbildende Autoimmunerkrankung der Haut (Schmidt und Zillikens, 2013). Gerade in den letzten zwei Jahrzehnten konnte eine Zunahme der Häufigkeit beobachtet werden (Langan et al., 2008, Joly et al., 2012, Forsti et al., 2014). Die zugrunde liegenden Ursachen für die zunehmende Inzidenz des bullösen Pemphigoids sind jedoch kaum bekannt. Insgesamt wurde berichtet, dass über 50 Medikamente ein bullöses Pemphigoid auslösen können (Stavropoulos, Soura und Antoniou, 2014). Die Verwendung von DPP-IV Inhibitoren wurde sowohl in Fallberichten als auch in Berichten der nationalen Pharmakovigilanz-Datenbank als Risikofaktor für BP untersucht (Bene et al, 2016, García et al, 2016).

Varpuluoma et al. haben den Zusammenhang zwischen den DPP-IV Inhibitoren und dem bullösen Pemphigoid anhand von Daten aus den finnischen nationalen Registern untersucht (Varpuluoma et al. 2018). Nach Berücksichtigung von Diabetes und mehreren neurologischen Störungen war die Verwendung von DPP-IV Inhibitoren im Vergleich zur Kontrollpopulation mit einem deutlich erhöhten Risiko für ein bullöses Pemphigoid verbunden. Vildagliptin war sogar mit einem zehnfach erhöhten Risiko für die Entwicklung eines bullösen Pemphigoids verbunden. Auch Kombinationstherapien mit Metformin und Sitagliptin oder mit Metformin und Vildagliptin zeigten ein erhöhtes Risiko, wobei Metformin als Monotherapie mit keinerlei Risikoerhöhung verbunden war. Das Patientenalter hatte keinen signifikanten Einfluss, wenn bei den an BP erkrankten Patienten DPP-IV Inhibitoren verwendet wurden. Die mittlere Inkubationszeit von der Vildagliptin-Exposition bis zur Diagnose eines bullösen Pemphigoids betrug 449 Tage. Bei Frauen war das Risiko einer BP-Diagnose nach der DPP-IV Inhibitoren im Vergleich zu Männern erhöht (Varpuluoma et al. 2018). Nach Varpuluoma et al. wurde in keiner früheren Registerstudie ein Zusammenhang zwischen Vildagliptin und dem bullösen Pemphigoid festgestellt. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Beobachtungen aus Pharmakovigilanz-Datenbankberichten nicht überein, bei denen BP unter Vildagliptin-Therapie am häufigsten auftrat. (Varpuluoma et al., 2018, Bene et al., 2016, García et al., 2016). Darüber hinaus stützen frei verfügbare Informationen aus der europäischen Datenbank für vermutete unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) die Ergebnisse von Varpuluoma et al.: Bis Dezember 2017 wurden in dieser Datenbank 408 Vildagliptin-assoziierte BP-Verdachtsfälle (von insgesamt 3653 UAW) erfasst, während es deutlich

weniger Pemphigoid-Fälle im Zusammenhang mit Sitagliptin waren (173 der insgesamt 12439 UAW).

Seit dem Jahr 2011 werden immer mehr Fallberichte veröffentlicht, die einen Zusammenhang zwischen DPP-IV Inhibitoren und dem bullösem Pemphigoid herstellen. Die meisten davon betreffen Vildagliptin, einige Fälle wurden jedoch auch während der Therapie mit Linagliptin, Sitagliptin, Anagliptin und Alogliptin berichtet (Varpuluoma et al. 2018). Die Inkubationszeit zwischen der Verwendung von DPP-IV Inhibitoren und dem Einsetzen des BPs liegt in diesen Berichten zwischen einem Monat und über vier Jahren, und in aktuellen Fallberichten schwankte die mittlere Inkubationszeit zwischen 6 und 19 Monaten (García et al, 2016, Bene et al, 2016). Wie bereits erwähnt betrug nach Varpuluoma et al. die durchschnittliche Zeit zwischen der Einnahme von Vildagliptin und der Diagnose eines BPs 449 Tage. Daher sollte Vildagliptin als möglicher Auslöser für ein bullöses Pemphigoid angesehen werden, auch wenn Vildagliptin vor der Diagnose des BP mehr als ein Jahr lang eingenommen wurde. Interessanterweise war eine Metformin-Monotherapie nicht mit dem BP assoziiert. Dies impliziert, dass bei BP-Fällen, die während einer Metformin-Vildagliptin-Kombinationstherapie diagnostiziert wurden, Metformin sicher fortgesetzt werden konnte, während ein Absetzen von Vildagliptin in Betracht gezogen werden sollte. Es ist noch unklar, ob es sich bei dem DPP-IV Inhibitoren-assoziierten BP um einen tatsächlichen medikamenteninduzierten BP handelt, der nach Absetzen des Arzneimittels tatsächlich verschwindet, oder ob es sich eher um einen durch das Arzneimittel verstärkten BP handelt, der trotz Absetzen des Arzneimittels bestehen bleibt (Varpuluoma et al. 2018).

Nach Varpuluoma et al. entwickeln Frauen häufiger als Männer BP nach der Einnahme von DPP-IV Inhibitoren. In Europa waren 58 % der Vildagliptin-, 65 % der Sitagliptin-, 46 % der Linagliptin- und 33 % der Saxagliptin-bedingten BP-Fälle Männer (García et al., 2016). In einem Fallbericht von 2017 wurde das Risiko des Auftretens von BP nach der Therapie mit DPP-IV Inhibitoren bei Männern erhöht (Benzaquen et al, 2017). Es sind jedoch weitere Studien erforderlich, um die Unterschiede zwischen den Geschlechtern für das Auftreten von BP während der Therapie mit DPP-IV Inhibitoren zu überprüfen (Varpuluoma et al 2018).

Es wurde berichtet, dass Vildagliptin und Sitagliptin auch Polyarthritiden auslösen können (Saito et al., 2013, Crickx et al., 2014). Es wurde auch vermutet, dass DPP-IV Inhibitoren das Risiko von Autoimmunerkrankungen verringern: nach einer Kohortenstudie aus den USA verringerte die Einnahme von Linagliptin, Saxagliptin oder Sitagliptin das Risiko für rheumatoide Arthritis,

systemischen Lupus erythematodes, Multiple Sklerose, Psoriasis und entzündliche Darmerkrankungen. Insgesamt liegen derzeit nur begrenzte Daten zum Zusammenhang von DPP-IV Inhibitoren mit anderen Autoimmunerkrankungen vor (Varpuluoma et al. 2008).

Plaquevent et al. haben die Häufigkeit der Gliptinaufnahme in einer großen Stichprobe von 1.787 bullöse Pemphigoid-Patienten, die zwischen 2012 und 2015 in Frankreich diagnostiziert wurden, mit der erwarteten Häufigkeit nach indirekter Altersstandardisierung bei 225.412 Personen aus der Datenbank des National Krankenversicherungsagentur verglichen (Plaquevent et al. 2019). Zusätzlich haben Plaquevent et al. die klinischen Merkmale und den Verlauf des Gliptin-assoziierten bullösen Pemphigoids beurteilt, abhängig davon, ob die Gliptin-Therapie fortgesetzt oder gestoppt wurde. Die beobachteten Häufigkeiten der Einnahme der gesamten Gliptin-Klasse und speziell die von Vildagliptin waren in der BP-Population höher als die in der Allgemeinbevölkerung nach Altersstandardisierung. Der Zusammenhang zwischen Gliptin und Metformin war ebenfalls höher als in der Allgemeinbevölkerung. Gliptin wurde in der 45,3 % von Fällen abgesetzt. Die mittlere Dauer bis zum Erreichen der Krankheitskontrolle, die Rate und die Verzögerung des Rezidivs unterschieden sich nicht davon, ob Gliptin abgesetzt oder fortgesetzt wurde. Diese Studie unterstützt nachdrücklich den Zusammenhang zwischen der Einnahme von Gliptin, insbesondere Vildagliptin, und dem Auftreten von BP (Plaquevent et al. 2019).

In einer Studie von Salemme et al. haben zwischen 2013 und 2020 prospektiv 74 Gliptin-assoziierte BP-Patienten aus 9 verschiedenen italienischen Dermatologieabteilungen teilgenommen. Parallel dazu hat auch eine Kohorte von 44 retrospektiv gesammelten Patienten mit idiopathischem bullösem Pemphigoid teilgenommen (Salemme et al. 2022). Ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von BP wurde mit Linagliptin verbunden. Die Latenzzeit zwischen der Therapie mit Gliptin und der BP-Diagnose lag zwischen 1 und 53 Monaten, mit einem Mittelwert von 9,5 Monaten. Die mittlere Latenzzeit zwischen der Therapie mit Gliptin und der Entwicklung von Pruritus betrug 3,1 Monate. Bei den italienischen Gliptin-assoziierten BP-Patienten wurden besondere immunologische Merkmale und eine erhöhte Häufigkeit des nicht entzündlichen Phänotypus nachgewiesen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass bei Gliptin-assoziierten BP-Patienten die humoralen IgG-, IgE- und IgA-Reaktionen auf die BP180- und BP230-Antigene abgeschwächt sind und zirkulierendes IgG auf andere BP180-Epitope als NC16A abzielt. Insbesondere die signifikante Reaktivität gegenüber E-1080 und E-1331 legt das Prinzip für diagnostische Verbesserung und

weitere Studien, die auf das Verständnis des Mechanismus des Gliptin-assoziierten BP-Ausbruchs abzielen (Salemme et al. 2022).

1.4 Fallberichte zum BP unter DPP-IV Inhibition

Im Detail wurde der erste Übersichtsartikel von Pasmazti et al. publiziert und beschreibt eine 59-jährige Frau und einen 67-jährigen Mann (Pasmazti et al. 2011). Bei beiden Patienten erfolgte die Einnahme von Metformin. Zwei Monate vor Ausbruch des BP wurde dann auch mit der zusätzlichen Einnahme von Vildagliptin begonnen. Beide Patienten hatten keine Vorerkrankungen. Die körperliche Untersuchung ergab eine diffuse bullöse Eruption meist auf einer erythematösen Basis. Bei beiden Patienten bestätigten die Ergebnisse der histologischen Untersuchung und der Immunofluoreszenzuntersuchung der Hautbiopsie die klinische Diagnose von BP. Die Laboruntersuchungen waren ohne pathologische Befunde, außer einer leichten peripheren Eosinophilie. Bei der Aufnahme der Patienten wurde die Behandlung mit Vildagliptin abgebrochen. Zusätzlich wurde die Patientin mit 0,5 mg/kg/Tag Methylprednisolon für 8 Wochen behandelt, während der Patient täglich 200 mg Doxycyclin für einen Zeitraum von 4 Wochen erhielt. Nach Absetzen der verdächtigen Medikamente wurde eine signifikante Verbesserung der Eruption, insbesondere bei dem männlichen Patienten beobachtet. Eine komplette Remission wurde 10 bzw. 8 Wochen nach Absetzen von Vildagliptin erreicht (Pasmazti et al. 2011).

Der zweite Bericht wurde von Skandalis et al. publiziert und enthielt eine Reihe von zwei weiblichen (78 und 80 Jahre alt) und drei männlichen (72, 67 und 75 Jahre alt) Patienten (Skandalis et al. 2012). Alle Patienten nahmen Metformin für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 für verschiedene Zeiträume vor der Einnahme der DPP-IV Inhibitoren als ergänzende Therapie ein. Außer der 80-jährigen Patientin, die Sitagliptin eingenommen hat, wurden die anderen Patienten mit Vildagliptin behandelt. Bis auf den 72-jährigen Patienten mit Psoriasis konnten bei den Patienten keine Autoimmun-, Neoplastischen- oder Infektions-Vorerkrankungen festgestellt werden. Die klinischen und histologischen Befunde deckten einen moderaten BP auf. Bei allen Patienten wurde die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 ersetzt. Sehr interessant war, dass, abgesehen von dem 72-jährigen Patienten, eine

anhaltende Remission bei allen Patienten nach Absetzen der DPP-IV Inhibitoren in Kombination mit Methylprednisolon beobachtet wurde (Skandalis et al. 2012).

Anschließend beschrieben Bene et al. drei Fallberichte (eine 86-jährige Patientin, eine 77-jährige Patientin und einen 79-jährigen Patienten) zum BP unter DPP-IV Inhibitoren (Bene et al. 2015). Alle Patienten nahmen Vildagliptin in Kombination entweder mit Metformin oder mit Gliclazide ein. Außer der 79-jährigen Patientin, die Bluthochdruck und erhöhten Blutfettwerteaufwies, hatten die anderen zwei Patienten keine Vorerkrankungen wie Autoimmun- oder Infektions-Krankheiten. Bei allen Fällen wurde eine komplette Remission nach dem Absetzen des Vildagliptins und der gleichzeitigen Therapie mit Clobetasolpropionat-Salbe beschrieben (Bene et al. 2015).

Ein Fallbericht ist auch von Attaway et al. beschrieben worden (Attaway et al. 2014). Es geht um einen 70-jährigen Patient mit Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Anämie und stattgehabten Herzinfarkt als Vorerkrankungen ohne Autoimmun- oder neoplastische Vorerkrankungen. Als Therapie für den Diabetes hat der Patient die Kombination von Metformin und Sitagliptin für den Zeitraum eines Monats eingenommen. Bei dem Patienten wurde BP klinisch sowie histologisch festgestellt. Der Patient wurde mit intravenösem Methylprednisolon 60 mg / 8 Stunden für 3 Tage und anschließend mit p.o. Prednisolon 0.75 mg / kg / Tag behandelt. Sitagliptin wurde auch ersetzt, und nach 2 Monaten wurde eine komplette Remission beobachtet (Attaway et al. 2013).

Im Jahr 2016 haben Mendonca et al. 3 Fallberichte beschrieben (Mendonca et al. 2016). Diese Fälle waren ein 82-jähriger Mann, der an arterieller Hypertonie, Dyslipidämie, Hyperurikämie und mittelschwerer chronischer Niereninsuffizienz litt, sowie eine 77-jährige Patientin und eine 72-jährige Patientin ohne andere Vorerkrankungen. Bei dem ersten Patienten wurde Linagliptin 45 Tage vor Beginn des Ausbruchs eingeführt, während beide Frauen mit einer Kombination aus Vildagliptin und Metformin behandelt wurden. Bei allen Patienten wurde klinisch und histologisch die Diagnose des BP gestellt. Der Patient wurde mit Dexamethason beginnend bei 4 mg b.i.d. entlassen und Antihistaminika wurden 3 Wochen lang verabreicht. Nach Beendigung der Behandlung mit Glukokortikoiden kam es zu einem Rezidiv bei dem Patienten mit typischer BP-Blase. Danach wurde Linagliptin abgesetzt sowie eine Therapie mit 15 mg Prednisolon einmal täglich und topischer Betamethason-Gentamicin-Creme eingeleitet und eine komplette Remission beobachtet. Beide Patientinnen wurden mit Prednisolon

Stoßtherapie und Absetzen des verdächtigen Medikamentes behandelt, was eine Krankheitskontrolle ermöglichte (Mendonca et al. 2016).

Harada et al. haben einen Fallbericht bei einem 78-jährigen Patienten mit Leberzirrhose beschrieben, der nach der Einnahme von Sitagliptin ein BP entwickelte (Harada et al. 2017). Eine Hautbiopsie bestätigte diese Diagnose. Eine zusätzlich durchgeführte Ultraschalluntersuchung ergab mehrere Lebertumoren. Sitagliptin wurde auf Insulin umgestellt und eine Therapie mit Kortikosteroiden wurde begonnen. Seine Niereninsuffizienz verschlechterte sich, und er verstarb 14 Tage nach dem Krankenhausaufenthalt (Harada et al. 2017).

Vor kurzem haben Yoshiji et al. 5 weitere Fälle beschrieben (Yoshiji et al. 2018). Im Detail waren es ein 81-jähriger Patient und eine 86-jährige Patientin, die Linagliptin einnahmen, ein 63-jähriger Patient, der Anagliptin einnahm, eine 86-jährige Patientin, die Vildagliptin einnahm und eine 83-jährige Patientin, die mit Linagliptin behandelt und dann auf Sitagliptin umgestellt wurde. Die klinische Diagnose von BP wurde bei allen Patienten pathologisch bestätigt. Der 81-jährige Patient wurde mit 20 mg Prednisolon / Tag behandelt. Linagliptin wurde später als Ursache von BP vermutet. Die Remission wurde nach Absetzen von Linagliptin erreicht. Die 86-jährige Patientin erhielt 20 mg Prednisolon / Tag, das sich über 10 Monate auf 2 mg / Tag reduzierte. Es traten jedoch wieder gespannte Blasen auf und die Prednisolondosis wurde erneut erhöht. Zu diesem Zeitpunkt wurde Linagliptin als Ursache für BP vermutet und abgesetzt. Nach der Umstellung von Linagliptin wurde eine Remission erreicht. Bei dem 63-jährigen Patienten wurde die Behandlung des BP mit Prednisolon (20 mg / Tag) begonnen. Anagliptin wurde auch umgestellt und eine komplette Remission innerhalb von 14 Tagen erreicht. Die Therapie der 86-jährigen Patientin wurde mit 40 mg / Tag Prednisolon begonnen. Aufgrund einer Verschlechterung der Hautsymptome erhielt die Patientin dann intravenöses Immunglobulin. Nach der Umstellung von Vildagliptin wurde eine Remission erreicht. Zuletzt wurde die 83-jährige Patientin anfänglich mit Prednisolon (15 mg / Tag) behandelt, das nach 3 Tagen aufgrund einer schlechten Kontrolle des BPs durch eine intravenöse Immunglobulintherapie ersetzt wurde. Die Hautläsionen nahmen nach dem Wechsel von Linagliptin zu Insulin stetig ab (Yoshiji et al. 2018).

1.5 Blasenbildende Autoimmunerkrankungen

Bei blasenbildenden Autoimmundermatosen handelt es sich um eine heterogene Gruppe von seltenen Erkrankungen, die sich durch Autoantikörper gegen verschiedene Adhäsionsproteine der Haut und Schleimhäute auszeichnen und mit einer erhöhten Mortalität und ausgeprägten Morbidität einhergehen. In der Gruppe der Pemphiguserkrankungen richten sich diese Autoantikörper gegen desmosomale Proteine von Keratinozyten und in den an Pemphigoiderkrankten gegen Proteine der Hemidesmosomen. Bei der Dermatitis Herpetiformis Duhring sind die Autoantikörper gegen die Transglutaminasen 2 und 3 gerichtet, welche keinen strukturellen Bestandteil der dermoepidermalen Junctionszone (DEJ) sind (Hammers et al. 2014). (siehe Tab. 1).

In dieser Arbeit wird das Augenmerk auf das bullöse Pemphigoid (BP) und die BP-like Subtype der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) gerichtet.

Erkrankungsgruppe	Unterform	Zielantigene
Pemphigusgruppe	Pemphigus vulgaris	Desmoglein (Dsg)3, Dsg 1
	Pemphigus Foliaceus	Dsg 1
	Paraneoplastischer Pemphigus	Envoplakin, Periplakin, Dsg1, Dsg3, BP230, A2ML1, Dsc1-3, Desmoplakin I/II
Pemphigoidgruppe	Bullöses Pemphigoid	BP180-NC16A, BP230
	Epidermolysis Bullosa Acquisita	Kollagen VII
	Pemphigoid gestationis	BP180-NC16A, BP230
	Lineare IgA-Dermatose	LAD-1, BP230
	Anti-p200/Laminin γ 1-Pemphigoid	Laminin γ 1 (p200-Protein)
	Schleimhautpemphigoid	BP180-NC16A, Laminin 332, BP230, α 6 β 4-Integrin, Laminin 311, Kollagen VII
	Dermatitis Herpetiformis Duhring	Epidermale/gewebsständige Transglutaminase

Tabelle 1: Blasenbildende Autoimmundermatosen und deren Zielantigen (Nach Hammers et al. 2014).
Dsg: Desmoglein, Dsc: Desmocollin.

1.6 Bullöse Pemphigoid und Epidermolysis bullosa acquisita

1.6.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das bullöse Pemphigoid (BP) ist eine blasenbildende Autoimmunerkrankung, die sich klinisch durch die Bildung von Blasen an der Haut auszeichnet. BP ist mit Abstand die häufigste bullöse Autoimmundermatose. Es handelt sich um eine Erkrankung des älteren Menschen und tritt meist im 8. und 9. Lebensjahrzehnt auf (Hammers et al. 2014). Frauen sind etwas häufiger betroffen als Männer.

Die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) ist eine erworbene Autoimmunerkrankung, die durch einen chronischen Verlauf charakterisiert wird. Die EBA befällt sowohl die Haut als auch die Schleimhäute und wird von subepidermaler Blasenbildung unterschieden (Hertl und Schuler 2002a). Nach Bertram et al. wurde die Inzidenz der EBA von 0,5 Neuerkrankungen pro eine Million Einwohner pro Jahr angegeben (Bertram et al. 2009). Die EBA tritt meist zwischen der 4. und 5. Lebensdekade auf (Gammon 1988) und kommt weltweit ohne Geschlechtsprädisposition vor (Gammon und Briggaman 1993).

Die Prävalenz von bullösem Pemphigoid (BP) variiert in verschiedenen Bevölkerungsgruppen und Regionen. In Europa und Nordamerika wird eine Prävalenz von 20 – 50 Fällen pro Million Einwohner pro Jahr berichtet.

Eine Studie aus dem Jahr 2019, die in Deutschland durchgeführt wurde, zeigte eine Prävalenz von 36,4 Fällen pro 1 Million Einwohner pro Jahr. Eine weitere Studie aus dem Jahr 2017 ergab eine Prävalenz von 42,1 Fällen pro 1 Million Einwohner pro Jahr in Frankreich.

Es ist jedoch zu beachten, dass die Prävalenz von BP aufgrund von Unterschieden in der Diagnose, der Erfassung und der Meldung von Fällen in verschiedenen Ländern und Regionen variieren kann (Heelan et al. 2019, Kridin K. 2018, Lamberts et al. 2017, Schmidt und Zillikens 2013).

Mehrere andere mögliche Auslöser werden für das Auftreten des BP beschrieben. Verletzungen, Verbrennungen, ultraviolettes Licht oder Radiotherapie stellen Risikofaktoren dar (Schmidt und Zillikens 2013). Eine Assoziation zwischen BP und der Einnahme bestimmter

Medikamente ist auch beobachtet worden. Darüber hinaus konnte die Einnahme von Spironolaktone, Phenothiazinen und Schleifendiuretika, als auch von Neuroleptika das Auftreten des BP fördern (Bastuji-Garin et al. 2011, Lloyd-Lavery et al. 2013). Die Assoziation mit neurologischen Erkrankungen wie Demenz, Morbus Parkinson, Apoplex, Epilepsie und multipler Sklerose wurde ebenfalls beschrieben (Langan et al. 2011).

1.6.2 Klinik

Der erste Bericht über BP ist auf das Jahr 1940 datiert, in welchem eine Unterscheidung zwischen einer akuten und einer chronischen Form des Pemphigus getroffen wurde (Talbot et al. 1940). Die als akut bezeichnete Form zeigte mikroskopisch eine Akantholyse der Epidermis, im Vergleich zur chronischen Form, die keine Akantholyse der Epidermis zeigte. Anschließend wurde durch Walter Lever histologisch beim sogenannten Pemphigus vulgaris acutus eine intraepidermale Blasenbildung nachgewiesen, aber bei der chronischen Form wurde subepidermale Blasenbildung erwähnt (Lever 1953). So hat Lever den Pemphigus vulgaris chronicus beschrieben, welcher histologisch jedoch ein bullöses Pemphigoid war (Ghohestani et al. 2001).

Das BP kann klinisch jedoch vielgestaltig sein. In der Regel beginnt es mit juckenden Hautausschlägen.

Das früheste Stadium der Erkrankung wird als prämonitorisches Stadium bezeichnet. Es ist durch Pruritus und kleine, urtikarielle Hautveränderungen gekennzeichnet. Diese zeigt sich in Form von runden, roten und leicht erhabenen Hautflecken, die häufig von juckender, leicht geschwollener Haut umgeben sind. Mit der Zeit können sich diese Flecken zu Blasen und Erosionen entwickeln. Die Symptome dieses Stadiums können über Wochen oder Monate anhalten, bevor die Erkrankung in ein fortgeschrittenes Stadium übergeht (Schmidt and Zillikens 2013, Schmidt et al. 2019).

Anhand der klinischen Zeichen ist die Diagnosestellung in diesem Stadium schwierig. Das folgende Stadium zeichnet sich durch Bläschen und Blasen auf normaler oder erythematös veränderter Haut aus (siehe Abb. 3). Die Blasen sind prall, weisen einen serösen oder hämorrhagischen Inhalt auf und ihr Durchmesser schwankt von wenigen Millimetern bis mehrere Zentimeter (Schulze et al. 2013). Beim BP ist das Nikolski-Zeichen (Induktion von

Blasen durch tangentielle Scherkräfte) negativ aber nach mechanischer Irritation können die Blasen platzen und Erosionen mit hämorrhagischen Krusten entstehen. Typischerweise sind die verschiedenen Entwicklungsstadien von Blasen, Erosionen und Krusten erkennbar. Prädilektionsstellen sind das untere Abdomen, die Beugen von Armen und Beinen, die Oberschenkelinnenseiten, und die intertriginösen Bereiche, wobei die Hautveränderungen meist symmetrisch sind (Schulze et al. 2013). Bei Patienten mit hoher Krankheitsaktivität und bei 10 – 30% der Fälle sind auch Schleimhautläsionen, vor allem oral, möglich (Hertl und Schuler 2002a).



Abbildung 3: Klinisches Erscheinungsbild des bullösen Pemphigoids (BP). Große, stabile Blasen auf flächigen, urtikariellen Erythemen im Bereich des Unterschenkels. Quelle: Die Online-Enzyklopädie der Dermatologie, Venerologie, Allergologie und Umweltmedizin.

Die klassische Form der EBA ist eine mechanobullöse, nicht inflammatorische Dermatose mit akraler Betonung. Es kommt durch minimale Verletzungen zur Bildung von prallen Blasen. Meist betroffen sind die Hände und Füße, die Ellenbogen und Knie, sowie der Sakralbereich. Außerdem kommt es oft zu einer Beteiligung der Mundschleimhaut mit Erosionen und danach Atrophisierung (siehe Abb. 4) (Hertl und Schuler 2002a). Schwere Verlaufsformen können zu einer Fibrosierung an Händen und Fingern sowie zu Ösophagusstenosen, Haar-, Nagelverlust und Erblindung führen. Leichte Formen ähneln der Porphyria cutanea tarda und schwere Formen zeigen Ähnlichkeit mit der hereditären dystrophen Epidermolysis bullosa (Hertl und Schuler 2002a). Außer dieser mechanobullösen EBA Form wurden verschiedene entzündliche Typen beschrieben, die klinische Charakteristika des bullösen Pemphigoids haben. Bei diesen

Subtypen findet sich keine ausgeprägte Hautfragilität, kaum Narben- und Milienbildung, sowie eine abweichende Verteilung der Blasen und Erosionen an Stamm, Extremitäten und intertriginösen Arealen (Hertl und Schuler 2002a). Die Form der EBA, die im Kindesalter aufgetreten ist, kann einen heterogenen inflammatorischen Phänotyp aufweisen, der dem kindlichen Pemphigoid oder der linearen IgA-Dermatose ähneln und nur aufgrund der serologischen Ergebnisse unterschieden werden kann (Hertl und Schuler 2002a). Das Auftreten der EBA wurde auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie dem systemischen Lupus erythematodes (SLE), der rheumatoiden Arthritis, Morbus Crohn sowie Psoriasis, beschrieben (Endo et al. 1997; Hertl und Schuler 2002a).



Abbildung 4: Klinisches Erscheinungsbild der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA). Bei der klassischen Form wird ein akrales Auftreten der Blasen und Erosionen beschrieben (a), im Vergleich zu dem entzündlichen Typ der EBA, bei dem eine abweichende Verteilung der Blasen und Erosionen an Stamm und Extremitäten beobachtet wird (b). Dieser Subtyp der Erkrankung kann auch die klinischen Charakteristika des bullösen Pemphigoids haben (c). Eine Beteiligung der Mundschleimhaut kommt es auch sehr häufig (d). Quelle: Klinik für Dermatologie, Universität zu Lübeck.

1.6.2.1 Bullous Pemphigoid Disease Area Index Score

In den späten 1980er Jahren begann die Entwicklung des Bullous Pemphigoid Disease Area Index (BPDAI) Score. Es wurde von einem Team von Dermatologen geleitet, die den Bedarf an einer standardisierten Methode zur Bewertung der Krankheitsaktivität bei Bullöser Pemphigoid erkannten (Vaillant L. et al. 1998). Die ursprüngliche Version des BPDAI-Scores basierte auf der Beobachtung klinischer Merkmale wie Anzahl und Größe von Blasen und

Erosionen, Vorhandensein von Krusten und Schuppen und Ausdehnung der betroffenen Körperfläche. Zusätzlich gibt es auch den Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS). ABSIS-Score ist ein Instrument zur Beurteilung des Schweregrades der Erkrankung und zur Überwachung des Behandlungsansprechens bei allen Patienten mit bullösen Autoimmunerkrankungen (AIBD) (Joly et al. 2012). Der ABSIS-Score bewertet das Ausmaß und den Schweregrad von Blasenbildung, Erythem und Erosionen an der Haut und den Schleimhäuten. Es berücksichtigt auch die Verteilung von Läsionen und das Vorhandensein von Pruritus (Juckreiz). Die maximale Punktzahl beträgt auf 270, wobei die höheren Punktzahlen eine schwerere Erkrankung anzeigen (Murrell DF. et al. 2019).

Die erste Veröffentlichung zum BPDAl-Score erfolgte im Jahr 1994 in der Zeitschrift „Archives of Dermatology“. Seitdem wurden zahlreiche Studien durchgeführt, um die Zuverlässigkeit, Validität und klinische Anwendbarkeit des Scores zu überprüfen und zu verbessern (Zillikens et al. 1995, Joly P. et al. 2002).

In den letzten Jahren wurden mehrere Änderungen am BPDAl-Score vorgenommen, um ihn an aktuelle Standards der klinischen Praxis anzupassen und seine klinische Relevanz zu erhöhen. Eine aktualisierte Version des Scores wurde erstmals 2012 in der Zeitschrift "Journal of the American Academy of Dermatology" veröffentlicht (Venning VA et al. 2012, Yamagami J. et al. 2014, Schmidt E. et al. 2016, Murrell DF et al. 2019).

Eine kürzlich durchgeführte systematische Überprüfung und Meta-Analyse von Studien zum BPDAl-Score ergab, dass der Score eine zuverlässige Methode zur Bewertung der Krankheitsaktivität bei Bullöser Pemphigoid ist und dass er bei der Überwachung der Wirksamkeit von Therapien nützlich sein kann (Zaraa I. et al. 2018).

Insgesamt ist der BPDAl-Score zu einem wichtigen Instrument für Dermatologen geworden, um die Schwere und Ausdehnung von Bullösem Pemphigoid bei Patienten zu bewerten und die Wirksamkeit von Behandlungen zu überwachen. Zahlreiche Studien haben seine Nützlichkeit und Zuverlässigkeit bestätigt und weitere Forschung ist geplant, um ihn weiter zu verbessern und an die sich ändernden Anforderungen der klinischen Praxis anzupassen (Yamagami J. et al. 2018, Yancey KB. Et al. 2019).

1.6.3 Verlauf und Prognose

Das BP ist meistens eine chronische rezidivierende Dermatose und ist häufig im Verlauf von mehreren Jahren selbstlimitierend (Wojnarowska et al. 2001). Der spontane Verlauf der Erkrankung ohne jegliche Behandlung kann variieren und hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie zum Beispiel dem Alter des Patienten, dem Schweregrad der Symptome und der betroffenen Körperregion. In der Regel verläuft das bullöse Pemphigoid ohne Behandlung chronisch und schubweise, mit Phasen, in denen sich die Symptome verschlimmern (Exazerbationen) und Phasen, in denen die Symptome abklingen (Remissionen). Die Dauer der einzelnen Phasen kann variieren und von wenigen Wochen bis zu mehreren Monaten oder Jahren reichen. Ohne Behandlung können die Symptome des bullösen Pemphigoids schwerwiegend sein und zu Komplikationen wie Infektionen, Narbenbildung oder Augenproblemen führen (Bernard P. et al. 1995, Kridin K. et al. 2018, Joly P. et al. 2002). Eine Remission kann im Durchschnitt innerhalb von fünf Jahren erfolgen (Wojnarowska et al. 2001). Meist sind die Rezidive nicht so schwerwiegend (Ghohestani et al. 2001; Korman 1987). Eine ungünstige Prognose haben Patienten mit einem hohen Lebensalter, einer hochdosierten Therapie mit Glukokortikoiden, einem niedrigen Serumalbumin und einer hohen Blutsenkungsgeschwindigkeit (Joly et al. 2005; Joly et al. 2009; Rzany et al. 2002). Die Mortalität liegt in Europa zwischen 19 und 41% im ersten Jahr der Erkrankung (Bystryn and Rudolph 2005), und hat hauptsächlich mit dem Alter der Patienten, der Polymorbidität oder mit Erkrankungen der Atemwege zu tun (Parker et al. 2008, Gudi et al. 2005).

1.6.4 Pathogenese

1.6.4.1 Antikörper BP

Die Autoantikörper, die für die Pathogenese des BP verantwortlich sind, erkennen zwei Strukturproteine der Haut, BP180 und BP230. Es handelt sich um zwei Strukturproteine der Hemidesmosomen, die als Bestandteile der dermal-epidermalen Junctionszone das Zytoskelett der basalen Keratinozyten an den dermalen Kollagenen verankern (Schulze et al. 2013). Die Bindung der Antikörper an diese Strukturproteine ist von Bedeutung, weil diese Bindung das Komplement aktiviert. Das aktivierte Komplement führt zur Freisetzung von

proinflammatorischen Zytokinen aus den Keratinozyten, Degranulation von Mastzellen und zur Rekrutierung von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen in der Haut. Die aktivierte Neutrophilie bewirkt die Freistellung von proteolytischen Enzymen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die für die Separation der Epidermis von der Dermis verantwortlich sind (Jordon et al. 1985).

1.6.4.2 BP 180

BP 180 ist ein 180 kD transmembranes Glykoprotein des basalen Keratinozyten, das eine Typ-II-Orientierung bildet und aus einem intrazellulären N-Terminus, einer transmembranen Domäne sowie aus einem extrazellulären Carboxy- (C) -Terminus besteht (Giudice et al. 1992; Giudice et al. 1993; Hopkinson et al. 1992). Dieser letzte extrazelluläre Bereich enthält ungefähr 1000 Aminosäuren und umfasst 15 Kollagendomänen, die unterschiedliche Längen (von 15 bis 242 Aminosäuren) aufweisen. Diese Kollagendomänen sind voneinander durch kurze Gebiete nicht-kollagener (NC)-Sequenzen getrennt (Giudice et al. 1992) (siehe Abb. 5). Über den intrazellulären N-terminalen Anteil ist BP180 mit der hemidesmosomalen Plaque der basalen Keratinozyten assoziiert und bedeckt die Lamina lucida. Auf der anderen Seite reicht der C-terminale Anteil bis in die Lamina densa der epidermalen Basalmembran (Bedane et al. 1997; Masunaga et al. 1997). Deswegen ist die extrazelluläre Domäne aufgrund dieser Interaktion mit anderen Komponenten der Basalmembran sehr wichtig für die dermo-epidermale Adhäsion (Nonaka et al. 2000).

Die NC16A-Domäne von BP 180 wurde als immundominante Region identifiziert. Es wurde auch erwähnt, dass Autoantikörper gegen den Bereich der NC16A-Domäne eine Rolle bei der Entwicklung subepidermaler Blasenbildung in Patienten mit BP spielen könnten (Giudice et al. 1993). Mithilfe eines ELISA wurde festgestellt, dass über 90% der Patientenserum mit der NC16A-Domäne korrelieren (Nakatani et al. 1998; Zillikens et al. 1997a). Zusätzlich konnte die Bedeutung von Antikörpern gegen NC16A durch ein passives Mausmodell als auch mithilfe des Gefrieschnittmodells nachgewiesen werden. (Anhalt und Diaz 1987, Liu et al. 1993, Sitaru et al. 2002b).

Die Spezifität von BP180-Antikörpern beim bullösem Pemphigoid (BP) ist hoch und liegt bei etwa 95-98% (Kridin K., 2020). Der Nachweis von BP180-Antikörpern im Blutserum eines

Patienten ist ein wichtiger diagnostischer Indikator für BP. Es wurde auch gezeigt, dass der BP180-Antikörpertiter mit der Aktivität der BP-Krankheit korreliert. Eine Studie ergab, dass Patienten mit höheren BP180-Antikörpertitern eine signifikant höhere Krankheitsaktivität hatten als Patienten mit niedrigeren Titern (Heelan K. et al. 2018). Eine andere Studie zeigte, dass die Behandlung mit systemischen Kortikosteroiden zu einer signifikanten Verringerung des BP180-Antikörpertiters und einer Verbesserung der klinischen Symptome führte (Kneisel A. et al. 2011).

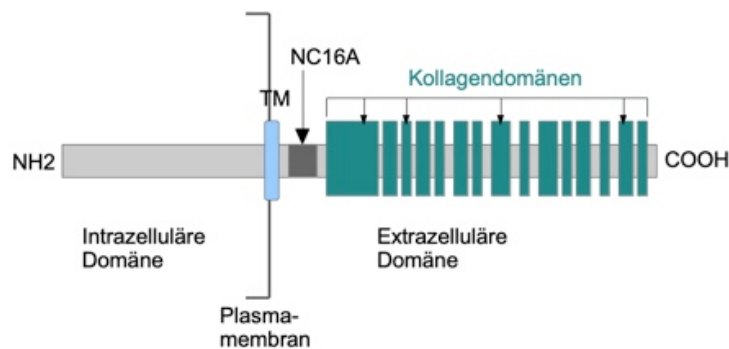


Abbildung 5: Abbildung von BP180 nach Ujiie et al. 2010. Der extrazelluläre Anteil des Proteins besteht aus Kollagendomänen. Diese Kollagendomänen sind durch nicht-kollagene (NC-) Domänen unterbrochen. Hauptantigen des BP ist das plasmamembrannahe NC16A.

TM: transmembrane Domäne.

1.6.4.3 BP 230

BP 230 wurde erstmals 1981 von Stanley et al. als Einzel epidermales 230/240 kD Polypeptid beschrieben. Dieses schließlich 230 kD schwere Protein gehört zur Plakinfamilie und stellt einen zyttoplasmatischen Bestandteil des Hemidesmosoms dar (Tanaka et al. 1991; Ruhrberg und Watt 1997). BP 230 besteht aus einer zentralen coil-coiled Domäne, die zwei globuläre Domänen hat (Borradori und Sonnenberg 1999). Seine C-Terminale Domäne hat die Fähigkeit, mit den Intermediärfilamenten zu assoziieren, was eine wichtige Rolle dieses Proteins spielt bei der Befestigung des Keratins an Intermediärfilamente zur hemidesmosomalen Plaque (Borradori und Sonnenberg 1999). Die N-terminale des BP 230 interagieren mit zyttoplasmatischen Teilen des BP 180 als auch mit den β 4-Integrinen (Hopkinson und Jones

2000; Schaapveld et al. 1998). Als immundominante Regionen von BP 230 wurden die B- und D-Subdomäne von COOH-Terminus beschrieben, aber auch ausgedehnte Bereiche vom N-Terminus konnten als Epitope nachgewiesen werden. Zusätzlich Autoantikörper, die zu der IgG4 und IgG1-Unterkategorie gehören, reagieren mit der BP 230 Schwanz (Skaria et al. 2000). Nach Thoma-Uszynski et al. binden über 80% der BP-Seren im ELISA an rekombinantes BP 230 (Thoma-Uszynski et al. 2004). Kiss et al. haben Mäuse mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen humanes BP 230 injiziert, um die pathogene Rolle von Anti-BP230-Antikörper zu untersuchen. Sie konnten feststellen, dass diese Mäuse klinische und immunopathologische Zeichen des BP entwickelten (Kiss et al. 2005).

Die Spezifität der BP230-Antikörper für die Diagnose des bullösen Pemphigoids (BP) beträgt etwa 90-95%. Die Sensitivität variiert jedoch zwischen den Studien und hängt auch von der verwendeten Testmethode ab. Eine systematische Überprüfung und Metaanalyse von 32 Studien ergab eine durchschnittliche Sensitivität von 63,4% für BP230-Antikörper bei BP-Patienten. Die Sensitivität variierte zwischen den Studien von 30,6% bis 88,5%. Was die Korrelation zwischen BP230-Antikörpertitern und der Aktivität der BP-Erkrankung betrifft, so gibt es keine einheitlichen Ergebnisse. Einige Studien haben gezeigt, dass höhere Titer von BP230-Antikörpern mit einer höheren Krankheitsaktivität korrelieren, während andere Studien keine solche Korrelation gefunden haben. Insgesamt scheinen BP230-Antikörper jedoch ein nützlicher Marker für die Diagnose von BP zu sein, und ihre Bestimmung kann bei der Überwachung der Krankheitsaktivität und der Wirksamkeit der Behandlung helfen (Kridin K. et al. 2018, Lamberts A. et al. 2016, Ludwig RJ. Et al. 2012).

1.6.4.4 Antikörper EBA

Die Autoantikörper gegen Typ-VII-Kollagen, die für die EBA verantwortlich sind, gehören zu der IgG-Klasse und vor allem zu den IgG1 und IgG4 Subklassen. Seltener konnten Antikörper von der IgA-Klasse in den Seren von EBA-Patienten nachgewiesen werden (Cho et al. 1998; Sitaru et al. 2004). Im Mausmodell korrelierten die IgG-Titer mit der Krankheitsschwere; allerdings zeigt, dass keine Korrelation zwischen den zirkulierenden Antikörpern und ihren komplementbindenden Eigenschaften mit dem klinischen Phänotyp besteht (Gandhi et al. 2000, Sitaru et al. 2005).

1.6.4.5 Typ-VII-Kollagen

Das Typ-VII-Kollagen ist wichtig für die Stabilität und Integrität der Haut und bildet Ankerfibrillen, die die Epidermis mit der darunterliegenden Dermis verbinden. (Briggaman and Wheeler 1975; Sakai et al. 1986). Das Typ-VII-Kollagen besteht aus drei identischen α -Ketten. Jede Kette besteht aus einer zentralen kollagenen Tripelhelix, welche von einer carboxyterminalen nichtkollagenen NC-2 Domäne und einer großen aminoterminalen nicht kollagenösen NC-1 Domäne eingeschlossen werden. Diese NC-1 Domäne enthält die Hauptepitope, die von dem Serum der Patienten mit EBA erkannt werden (Hertl and Schulter 2002b). Kollagen VII bindet durch diese Domäne mit verschiedenen Strukturproteinen, wie Laminin-5 in der Lamina densa der dermoepidermalen Basalmembran und führen zu einer Störung der Adhäsionsfunktion von Kollagen VII (Hert and Schulter 2002b; Shimizu et al. 1997). Bei dem Subtyp der EBA, der im Kindesalter aufgetreten ist, liegt der immunodominante Abschnitt des Typ-VII-Kollagens nicht in der NC1-Domäne. Zusätzlich wurden Autoantikörper gegen verschiedene Epitope des Typ-VII-Kollagens bei den inflammatorischen Subformen der EBA beschrieben.

Es gibt verschiedene Mechanismen, die zur Blasenbildung führen. Es ist bekannt, dass die Autoantikörper der EBA mit den Strukturproteinen wie Laminin 5 und Fibronectin interagieren und die Interaktion von Typ-VII-Kollagen vermindern (Chen et al. 1999; Gammon et al. 1993). Diese Reihenfolge von Ereignissen führt zur Fragilität der Haut sowie zu einer nicht-entzündlichen Reaktion bei der klassischen Form der EBA (Remington et al. 2008). Andererseits führt die Aktivierung von Komplement und Leukozyten zu einer entzündlichen Reaktion, welche klinisch dem Krankheitsbild des BP ähnelt (Gammon et al. 1984).

1.6.4.5.1 Pathophysiologie des EBA-Mausmodells

Die Pathophysiologie der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) im Kollagen-VII-Mausmodell basiert auf einer Autoimmunreaktion gegen das Typ-VII-Kollagen (Sitaru C. 2007).

Im transgenen Kollagen-VII-Mausmodell wird eine Veränderung des Kollagen-VII-Gens herbeigeführt, um eine Defizienz oder Fehlfunktion des Kollagens VII zu simulieren. Durch diese Veränderung entwickeln die Mäuse ähnliche Merkmale wie bei der menschlichen EBA, einschließlich Autoantikörperbildung und Blasenbildung in der Haut.

Die Blasenbildung auf der Haut und den Schleimhäuten nach der Bindung der Autoantikörper stellt die T-Zellen-unabhängige Phase der Autoimmunantwort bei EBA dar (Sitaru C. 2007). Um diese Blasenbildung zu reproduzieren, werden gereinigte IgG-Antikörper gegen Kollagen Typ VII in Mäuse injiziert (Sitaru C. 2007, Sitaru et al. 2005, Woodley et al. 2005, Woodley et al. 2006). Der passive Transfer von Kaninchen-IgG, die gegen murines oder menschliches Kollagen Typ VII immunisiert sind, oder der passive Transfer von IgG von EBA-Patienten führt bei Mäusen zu einem Blasenphänotyp (siehe Abb. 6). Verschiedene Maus Stämme wie Nacktmäuse, BALB c- und C57BL/6-Mäuse sind anfällig für die Blaseninduktion durch die Injektion von Antikörpern gegen Typ-VII-Kollagen (Sitaru C 2007, Sitaru et al, 2005). Darüber hinaus entwickeln Mäuse des SKH-1-Auszuchtstamms Blasenbildung durch die passive Übertragung von Antikörpern, die für Typ-VII-Kollagen spezifisch sind. Eine Gesamt-IgG-Injektions-Dosis im Bereich von 20 bis 500 mg / g Körpergewicht kann bei den Mäusen 2–4 Tage nach der ersten Injektion Blasenbildung auslösen. Die Erkrankung tritt normalerweise 5–6 Tage nach der ersten Injektion auf. Das Abklingen der Erkrankung korreliert mit der verabreichten IgG-Dosis und der Konzentration von Typ-VII-Kollagen-spezifischen Antikörpern im Serum von Mäusen. Vor kurzem wurde die Pathogenität der Autoantikörper von EBA-Patienten durch den passiven Transfer der IgG-Fraktion von zwei Patienten in SKH-1-Mäuse gezeigt. Diese Beobachtung bestätigt, dass Autoantikörper von Patienten Blasen bei Mäusen auslösen können. In diesem Modell erfordert die Entwicklung von Blasen relativ große Mengen hochtitriger IgG-Präparate von EBA-Patienten. Allerdings zeigen die Antikörper von EBA-Patienten eine geringe Reaktivität und ein heterogenes Bindungsmuster an Mäusehaut; Einige EBA-Seren zeigen eine völlig fehlende Reaktivität mit diesem Substrat. Interessanterweise wurde bei erwachsenen Mäusen die Blasenbildung durch die passive Übertragung von Antikörpern gegen Typ VII-Kollagen induziert, während die neugeborenen Mäuse gegen experimentelles EBA resistent waren. Es ist immer noch nicht klar, warum neugeborene Mäuse nicht anfällig für die Blasenbildung durch Antikörper gegen Typ-VII-Kollagen sind (Sitaru C. 2007, Sitaru et al. 2005, Woodley et al. 2005, Woodley et al. 2006).

Type-VII-Kollagen

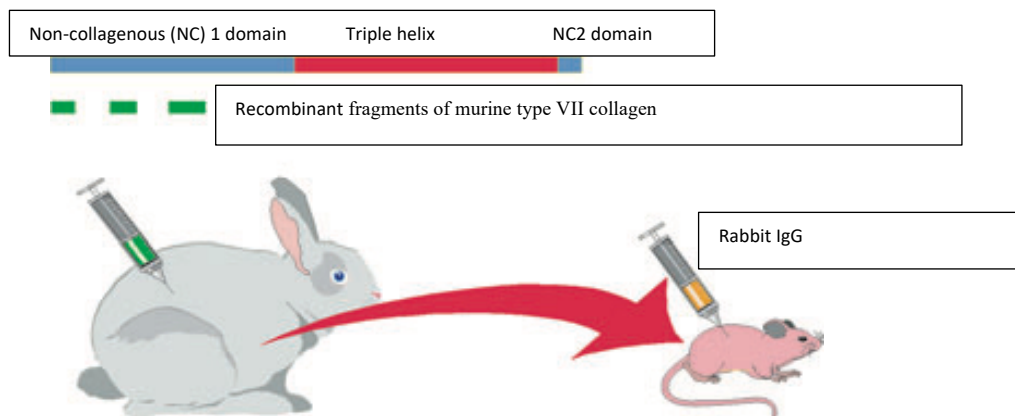


Abbildung 6: Das passive EBA-Mausmodell. Die Blasenbildung von EBA kann bei Mäusen durch die passive Übertragung von Antikörpern gegen Typ-VII-Kollagen reproduziert werden. Dafür werden in Kaninchen polyklonale Antikörper gegen Kollagen Typ-VII erzeugt. Das passiert durch die Immunisierung mit rekombinanten Formen der nicht-kollagenen (NC) 1-Domäne von murinem Kollagen Typ VII. Die IgG-Fraktion aus dem Immuns Serum von Kaninchen wird durch die Protein-G-Chromatographie gereinigt und anschließend werden damit die Mäuse injiziert (Sitaru C. 2007).

1.6.4.6 Komplement

Das Komplementsystem spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des bullösen Pemphigoids, da es sowohl zur Schädigung des Gewebes als auch zur Aktivierung der Entzündungsreaktion beitragen kann (Gammon 1989; Liu et al. 1995).

Das Komplementsystem ist ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und besteht aus einer Gruppe von Proteinen, die in einer Kaskade aktiviert werden, um eine Entzündungsreaktion auszulösen. Im bullösen Pemphigoid wird das Komplementsystem durch die Bindung von Antikörpern an Proteine in der Basalmembran aktiviert, was zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren und zur Anziehung von Immunzellen führt. Diese Immunzellen können dann das Gewebe schädigen und zu den typischen Blasenbildungen führen, die mit bullösem Pemphigoid assoziiert sind. Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie das Komplementsystem im bullösen Pemphigoid aktiviert werden kann. Eine Möglichkeit ist die Aktivierung des klassischen Komplementwegs durch die Bindung von Antikörpern an Kollagen XVII, ein Protein in der Basalmembran. Eine andere Möglichkeit ist die Aktivierung des

alternativen Komplementwegs durch die Bindung von Antikörpern an andere Proteine in der Basalmembran (Marshall 2004, Kasperkiewicz & Zillikens 2017, Schmidt & Zillikens 2013, Hofmann & Thoma-Uszynski 2015).

Die Rolle des Komplementsystems im bullösen Pemphigoid ist jedoch nicht vollständig verstanden und es wird noch weiter geforscht, um genauere Erkenntnisse darüber zu gewinnen.

Es ist bekannt, dass die Antikörper der EBA genau als BP-Antikörper das Komplement aktivieren können (Mooney et al. 1992). Außerdem wurde gezeigt, dass im Mausmodell bei C5-defizienten Mäusen, die durch Antikörper-Transfer immunisiert worden sind, keine Blasenbildung beobachtet wird (Sitaru et al. 2005).

1.6.4.7 Mastzellen

Mastzellen sind Immunzellen, die in verschiedenen Geweben vorkommen und in der Lage sind, schnell auf verschiedene Reize zu reagieren, einschließlich Allergene, Infektionen und Entzündungen. Sie können schnell entzündliche Mediatoren freisetzen, wie z.B. Histamin, Prostaglandine und Zytokine, die zur Rekrutierung von weiteren Immunzellen beitragen und die Entzündungsreaktion verstärken können.

In BP wurden erhöhte Mastzellzahlen in der Dermis und um die Blasen herum beobachtet. Eine Studie von O'Reilly et al. (O'Reilly et al. 2007) zeigte, dass Mastzellzahlen in der nicht-Blasen-bildenden Haut von BP-Patienten erhöht sind. Eine weitere Studie von Feliciani et al. (Feliciani et al. 2005) zeigte, dass Mastzellen in Blasen von BP-Patienten aktiviert und apoptotisch sind, was auf eine Beteiligung von Mastzellen an der Entzündungsreaktion hinweist.

In einer Studie von Liu et al. (Liu et al. 1994) wurde die Rolle von Mastzellen bei der Bildung von Blasen in einem Tiermodell für BP untersucht und zeigte, dass Mastzellen an der Entstehung von Blasen beteiligt sind, indem sie entzündliche Mediatoren freisetzen, die zur Rekrutierung von anderen Immunzellen und zur Bildung von Blasen beitragen.

In Tiermodellen für bullöses Pemphigoid (BP), wie z.B. in Mäusen, wurden Mastzellen ebenfalls als wichtige Akteure bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Erkrankung

identifiziert. Die Aktivierung von Mastzellen kann zu einer schnellen Freisetzung von entzündlichen Mediatoren wie Histamin, TNF-alpha und IL-6 führen, welche die Entzündungsreaktion im Gewebe verstärken und zur Schädigung der Epidermis beitragen.

In einer Studie von Kasprick et al. (Kasprick A. et al. 2014) wurde die Rolle von Mastzellen in einem Mausmodell für BP untersucht und zeigte, dass Mastzellen sowohl in der Akutphase als auch in der chronischen Phase der Erkrankung aktiviert sind und zur Entzündungsreaktion und Blasenbildung beitragen. In einer weiteren Studie von Li et al. (Li et al. 2018) wurde die Rolle von Mastzellen in einem Mausmodell für BP untersucht, das auf der Immunisierung mit dem BP180-Antigen basiert. Die Autoren fanden heraus, dass Mastzellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Blasen spielen, indem sie entzündliche Mediatoren freisetzen und die Rekrutierung von Immunzellen fördern.

In einer anderen Studie von Amber et al. (Amber et al. 2019) wurde die Rolle von Mastzellen bei der Wundheilung nach Blasenbildung in einem Mausmodell für BP untersucht. Die Autoren zeigten, dass Mastzellen eine wichtige Rolle bei der Heilung von BP-Blasen spielen, indem sie zur Rekrutierung von Immunzellen und zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren beitragen, die die Epithelialisierung und Wundheilung fördern. Eine bessere Kenntnis der Rolle von Mastzellen bei BP könnte zur Entwicklung neuer Therapien beitragen.

1.6.4.8 Neutrophile Granulozyten

Die Rolle der neutrophilen Granulozyten in der Pathogenese des BP wurde nicht nur in vivo, sondern auch in vitro beschrieben. Im Mausmodell mit neutropenen Mäusen konnten sich nach Injektion mit murinem anti-BP 180 IgG keine klinischen oder histologischen Zeichen des BP entwickeln (Liu et al. 1997). Weiterhin konnte eine Spaltbildung im Gefrierschnittmodell nur in Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten ausgelöst werden (Gammon et al. 1982; Sitaru et al. 2002b). Sehr wichtig für die Pathogenese des BP sind auch weitere Entzündungszellen, vor allem eosinophile Granulozyten (Zone et al. 2007). In Hautbiopsien von Patienten mit BP sind meist mehr eosinophile als neutrophile Granulozyten nachweisbar (Borrego et al. 1996). Zudem sind in den betroffenen Hautarealen auch Lymphozyten, Monozyten und Mastzellen nachweisbar (Liu et al. 1997).

Die neutrophilen Granulozyten spielen jedoch ebenfalls eine wichtige Rolle für die Pathogenese der EBA. Die Aktivierung des Komplements führt zur Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten, welche anschließend zur Freisetzung von ROS und Proteasen führen und eine Blasenbildung induzieren (Chiriac et al. 2007). Die Bedeutung von neutrophilen Granulozyten für die DES konnte auch im Gefrierschnittmodell gezeigt werden, durch Inkubation von Gewebe in EBA-Patientenserum (Sitaru et al. 2002a).

1.6.4.9 Proteolytische Enzyme und reaktive Sauerstoffspezies

Die aktivierten neutrophilen und eosinophile Granulozyten setzen sowohl reaktive Sauerstoffradikale (ROS) als auch Proteasen frei (Jordon et al. 1985; Schulze et al. 2013). In den Granula der neutrophilen Granulozyten sind verschiedene proteolytische Enzyme wie Kollagenase, Elastase oder Gelatinase B nachweisbar. Diese proteolytischen Enzyme können die Basalmembranzzone schädigen und zur DES führen (Weiss 1989). Im Mausmodell sind die Gelatinase B (Matrix-Metalloproteinase 9) und die Neutrophilen-Elastase von grundlegender Bedeutung (Liu et al. 1998; Liu et al. 2000). Gelatinase B reguliert die Effekte der Neutrophilen-Elastase, die hauptsächlich für die Spaltbildung verantwortlich ist, durch die Inaktivierung von Proteinase-Inhibitoren (Liu et al. 2000). Neutrophilen-Elastase und Gelatinase B wurden in Hautproben und in der Flüssigkeit der Blasen bei Patienten mit BP nachgewiesen (Verraes et al. 2001).

1.6.5 Diagnostik

Die Hauptinstrumente der Diagnostik bestehen nicht nur aus der Anamnese und dem klinischen Bild, sondern auch aus der Histopathologie, der direkten und indirekten Immunfluoreszenz, dem Immunoblot und dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).

1.6.5.1 Histopathologie

Für die histologische Biopsie sollte eine kleine Blase oder der Teil einer größeren Blase mit Übergang zur gesunden Haut untersucht werden (Schulze et al. 2013; Sitaru et al. 2004). Typisch für das bullöse Pemphigoid ist eine subepidermale Blasenbildung, bei der die gesamte Epidermis das Blasendach bildet. Diese Blasenbildung setzt sich aus einem Infiltrat von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, sowie von Makrophagen und T-Lymphozyten in der papillären Dermis zusammen (siehe Abb. 7). Eine eosinophile Spongiose kann auch vorausgehen aber die ist nicht für ein BP beweisend, da derselbe Befund auch bei anderen Dermatitisiden zu finden ist (Schmidt et al. 2011). Typische histologische Veränderungen sind für circa 60% der BP-Patienten beschrieben (Chan et al. 2003; Courville et al. 2000).

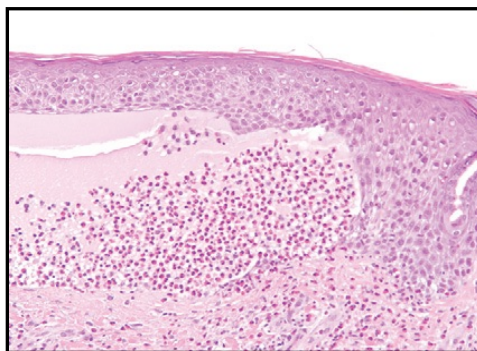


Abbildung 7: Histopathologischer Befund eines bullösen Pemphigoids. Sichtbar sind sowohl die subepidermale Blasenbildung, als auch das Vorkommen eosinophiler und neutrophiler Infiltrate. Quelle: Schmidt et al. 2013.

Die Histologie der EBA zeigt zunächst ein papilläres Ödem, welches einer dermoepidermalen Separation der Basalmembran folgt. Bei dem klassischen, mechanobullösen Subtyp der EBA findet sich gering Entzündungsinfiltrat, was vor allem aus neutrophilen Granulozyten besteht (Hertl und Schuler 2002c). Bei der entzündlichen Variante findet sich eine Infiltration aus eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten (siehe Abb. 8). Wegen der unterschiedlichen klinischen und histologischen Präsentationsformen ist die Diagnose der EBA allein anhand der Histopathologie nicht möglich (Sitaru et al. 2004).

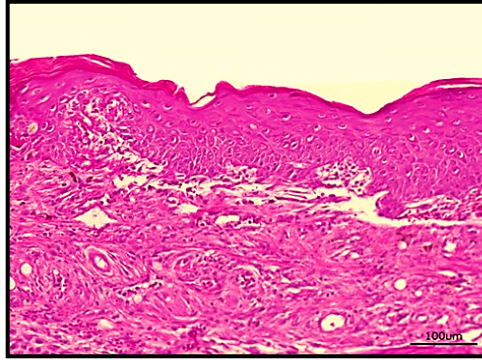


Abbildung 8: Histopathologischer Befund der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA). Die subepidermale Blasenbildung ist typisch für die EBA. Bei dem inflammatorischen Subtyp der EBA sind dermale Infiltrate aus Leukozyten nachweisbar. Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (H-E-Färbung), Vergrößerung 10fach.

1.6.5.2 Direkte Immunfluoreszenz

Den diagnostischen Goldstandard für das BP stellt die direkte Immunfluoreszenz (DIF) dar (Schmidt and Zillikens 2011). In der DIF können lineare Ablagerungen von C3 entlang der DEJ sowie von IgG in 80-90% der Fälle nachgewiesen werden. Gelegentlich finden sich zusätzlich schwächere Ablagerungen von IgA und IgE (Schulze et al. 2013). Eine läsionale Biopsie für die DIF kann falsch negativ sein, wenn in der vorliegenden Entzündung gebundene Autoantikörper und Komplement abgebaut werden, und falsch positiv sein, wenn die Antikörper unspezifisch am Blasendach oder Blasenboden aggregieren (Schulze et al. 2013; Sitaru et al. 2004). Die Autoantikörper und Komplemente setzen sich in bestimmten Mustern entlang der Basalmembranzzone ab, was zur Differenzialdiagnose der blasenbildenden Erkrankungen hilfreich ist (Vodegel et al. 2004).

In der direkten Immunfluoreszenz von EBA erkrankten Patienten finden sich lineare Ablagerungen vor allem von IgG und C3, sowie IgA entlang der DEJ (Hertl and Schuler 2002c). Ein ähnliches Bild zeigt sich bei Hautbiopsien von Patienten mit BP (Yaoita et al. 1981). Die Ablagerungen von Antikörpern und Komplement sind nicht immer linear, aber sie können unterschiedliche Muster bei den verschiedenen blasenbildenden Erkrankungen aufweisen, wie n- oder u-Zacken Muster an der Basalmembranzzone (Vodegel et al. 2004).

1.6.5.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Als Screeningtest für zirkulierende Antikörper im Serum dient die indirekte Immunfluoreszenz (IIF). Beim BP hat sich als geeignetes Substrat eine humane Hautprobe bewährt, die durch Inkubation mit 1 M NaCl-Lösung gespalten wurde (Schulze et al. 2013; Schmidt und Zillikens 2011). Zirkulierendes IgG, sowie IgM, IgE und IgA binden an den epidermalen Bereichen und das Blasendach des vorher erzeugten Spaltes (siehe Abb. 9) (Schmidt et al. 2011). Die Sensitivität der IIF wurde auf circa 80% nachgewiesen. Mit Affenösophagus als Substrat, konnte die Sensitivität nur auf 60-70% beziffert werden (Roussel et al. 2011; Schulze et al. 2013).

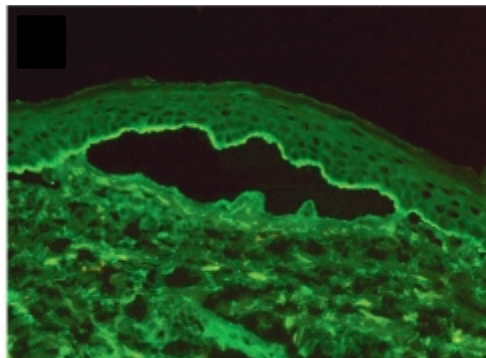


Abbildung 9: Indirekte Immunfluoreszenz beim bullösem Pemphigoid. Quelle: Schmidt et al. 2011.

Zirkulierende Antikörper in Seren von EBA erkrankten Patienten könnten auch mithilfe der IIF nachgewiesen werden. Dafür wurden meist auch humane Hautproben verwendet, welche vorher mit 1M NaCl-Lösung wie bei BP bearbeitet wurden (Ishii et al. 2010). Diese Antikörper binden an den dermalen Bereichen des Spaltes und sind bei ungefähr der Hälfte der Patienten nachweisbar. Eine dermale Bindung von Antikörper ist nicht nur für EBA, sondern auch für den bullösen SLE, den anti-p200 Pemphigoid und den vernarbenden Pemphigoid pathognomonisch (Hallel-Halevy et al. 2001, Sitaru et al. 2004).

1.6.5.4 ELISA

Antikörper gegen BP180 und BP230 können mittels kommerziell erhältlicher ELISA-Systeme nachgewiesen werden (Schulze et al.2013). Die Sensitivität bei der Kombination von BP180-

und BP230-ELISA liegt bei ca. 90% (Schulze et al. 2013). Unabhängig vom Alter lassen sich bei etwa 5% der dermatologischen Patienten ohne BP-Serumantikörper gegen BP180 oder BP230 im ELISA nachweisen (Wieland et al. 2010; Schulze et al. 2013).

Zirkulierende Autoantikörper gegen BP180-NC16A korrelieren mit der Krankheitsaktivität; die zuvor erwähnten ELISA-Testsysteme sind auch zur Verlaufskontrolle der jeweiligen Erkrankung geeignet und können nach dem Abklingen klinischer Symptome wichtige Hinweise auf ein bevorstehendes Rezidiv hinweisen (Schulze et al. 2013).

Woodley et al. entwickelten ein ELISA-Testsystem für die EBA, welches die Typ-VII-Kollagen Autoantikörper nachweisen kann. Jedoch ist dieses Testsystem noch nicht kommerziell verfügbar (Woodley et al. 1984; Hertl und Schuler 2002c). Autoantikörper gegen Typ-VII-Kollagen oder seine NC1- oder NC2-Domäne finden sich bei der EBA sonst nur bei dem bullösen SLE, deswegen ist das entsprechende klinische Bild der EBA sehr hilfreich (Hertl und Schuler 2002c).

1.6.5.5 Immunoblot

Für den Immunoblot werden verschiedene zelluläre Extrakte (aus kultivierten Keratinozyten, rekombinante Formen von BP180 und BP230 oder Epidermis) verwendet. Diese Extrakte übertragen auf eine Trägermembran werden in Patientenseren inkubiert (Chan et al. 2003; Schmidt et al. 2011). Die Autoantikörper werden gefärbt, wenn sie an die Antigene binden, sodass eine Reaktion angezeigt werden kann (Chan et al. 2003; Labib et al. 1986).

Diese Methode steht für spezielle Fragestellungen in spezialisierten Labors (u.a. Universitätskliniken in Lübeck, Marburg und Würzburg) zur Verfügung.

1.6.5.6 Immunelektronenmikroskopie

Mithilfe der Immunelektronenmikroskopie können die Blasenbildung im Bereich unter der Lamina densa oder bei manchen Patienten in der Lamina lucida nachgewiesen werden (Yaoita et al. 1981; Fine et al. 1989). In der direkten Immunelektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die EBA-Antikörper und Komplement in der Lamina densa und Sublamina densa

gebunden sind (Nieboer et al. 1980). Mithilfe der indirekten Immunelektronenmikroskopie lassen sich die gebundenen Antikörper in der Lamina densa nachweisen. Außerdem ist in manchen Fällen eine Bindung in der Dermis unterhalb der Lamina densa durch eine Reaktion mit der NC2-Domäne oder der tripelhelikalen kollagenen Domäne möglich (Ishii et al. 2009, McMillan et al. 2003).

1.6.5.7 BIOCHIP Mosaik

BIOCHIP Mosaik ist ein neuer Screeningtest für die serologische Diagnostik des BP, des Pemphigus vulgaris und des Pemphigus foliaceus. Mit einer einzelnen Serumprobe und in einem Inkubationsschritt können mithilfe dieser Methode verschiedene Substrate wie Affenösophagus, BP180-NC16A-Tetramere und BP230cG-exprimierende humane HEK293-Zellen in einem IIF-Assay untersucht werden (Schulze et al. 2013). Es gibt eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der konventionellen Methoden und des BIOCHIP Mosaik. Durch das hoch standardisierte BIOCHIP Mosaik wird die serologische Diagnostik von Blasenbildenden Autoimmundermatosen deutlich erleichtert (van Beek et al. 2012).

1.6.6 Therapie

Die Therapie des bullösen Pemphigoids hängt von der Schwere der Erkrankung ab. Ziel der Therapie ist es, die Blasenbildung zu reduzieren, den Juckreiz zu lindern und die Hautverletzungen zu heilen.

Die Behandlung umfasst in der Regel eine Kombination aus topischen und systemischen Medikamenten. Topische Medikamente wie Steroidsalben oder Immunmodulatoren können auf die betroffenen Hautstellen aufgetragen werden, um die Symptome zu lindern. Für ausgedehnte Formen des BP sind systemische Kortikosteroide die Therapie der ersten Wahl, wobei eine Therapie mit Prednison von 0,5 bis 0,75 mg / kg / Tag p.o. empfohlen wird. Außerdem werden systemische Medikamente wie Immunsuppressiva oder Immunmodulatoren oral oder intravenös verabreicht, um die Entzündung zu reduzieren und

die Autoimmunreaktion zu hemmen. Die am häufigsten verwendeten Medikamente sind Azathioprin, Mycophenolatmofetil, Methotrexat, Chlorambucil und Cyclophosphamid. Niedrige Dosen von Cyclophosphamid können Vorteile haben. Die Kombination von Nicotinamid und Minocyclin oder Tetracyclin kann als therapeutische Alternative verwendet werden.

Dapson kann verabreicht werden, insbesondere wenn eine Beteiligung der Schleimhaut vorliegt. Die Wirksamkeit von topischen Immunmodulatoren wie Tacrolimus sollte geprüft werden.

In schweren Fällen kann auch eine Plasmapherese oder intravenöse Immunglobulintherapie in Betracht gezogen werden (Kasperkiewicz et al. 2017, Schmidt et al. 2013, Murrell et al. 2019).

Bernard et al. (2017) untersuchte die Wirksamkeit von Rituximab bei der Behandlung von Patienten mit bullösem Pemphigoid, insbesondere bei Patienten, die unzureichend auf Kortikosteroide und Immunsuppressiva ansprachen. Die Autoren führten eine retrospektive Analyse von 24 Patienten mit bullösem Pemphigoid durch, die mit Rituximab behandelt wurden. Die Patienten erhielten eine initiale Dosis von 1000 mg Rituximab, gefolgt von einer zweiten Dosis 2 Wochen später. Die meisten Patienten erhielten auch Kortikosteroide und Immunsuppressiva. Die Ergebnisse zeigten, dass 16 der 24 Patienten (67%) eine klinische Verbesserung erfahren haben, definiert als Reduktion der Blasenbildung und Abnahme des Juckreizes. Bei 8 Patienten (33%) wurde keine Verbesserung festgestellt. Die Autoren stellten fest, dass die Ansprechrate bei Patienten, die zuvor mit Immunsuppressiva behandelt wurden, niedriger war als bei Patienten ohne vorherige Immunsuppression. Die Autoren folgerten, dass Rituximab eine wirksame Therapieoption für Patienten mit bullösem Pemphigoid sein kann, insbesondere für Patienten, die unzureichend auf Kortikosteroide und Immunsuppressiva ansprechen. Sie betonten jedoch, dass weitere Studien erforderlich sind, um die Wirksamkeit und Sicherheit von Rituximab bei der Behandlung von bullösem Pemphigoid zu bestätigen.

Die initiale Therapie der EBA besteht aus systemischen Kortikosteroiden in Kombination mit Immunsuppressiva wie Azathioprin, Methotrexat oder Cyclophosphamid (Schmidt 2009). Die Patienten mit der entzündlichen Form reagieren besser auf eine Therapie. Dagegen kann bei

Patienten mit dem entzündungsarmen, mechanobullösen Subtyp der EBA. eine vorübergehende Remission auftreten (Engineer und Ahmed 2001).

Dapson als Therapie kann zu einer klinischen Besserung der Patienten führen. Dapson hemmt die Chemotaxis und die Funktion der neutrophilen Granulozyten (Harvath et al. 1986). Die initiale Therapie kann mit 50 mg täglich begonnen werden; bis eine Remission erreicht wird, ist meist eine Dosierung von 100-250 mg erforderlich und muss über mehrere Monate beibehalten werden (Mutasim 2004).

Colchizin wirkt über die Hemmung der Polymerisation von Mikrotubuli und behindert verschiedene zelluläre Funktionen, wie die Chemotaxis und die Mitose (Ehrenfeld et al. 1980). Zusätzlich beeinflusst Colchizin sowohl die Freisetzung von Enzymen aus neutrophilen Granulozyten als auch die Sekretion von Antikörpern aus den Plasmazellen (Antoine et al. 1980; Bauer und Valle 1982). Die Tagesdosis von Colchizin schwankt zwischen 1 mg und 2 mg (Megahed und Scharffetter-Kochanek 1994, Cunningham et al. 1996). Als Nebenwirkung wurden gastrointestinale Beschwerden beobachtet (Engineer und Ahmed 2001).

Cyclosporin A findet bei der Therapie schwerer Fälle Anwendung. Es hemmt die Aktivierung von T-Zellen, natürlichen Killerzellen und Antigen-präsentierenden Zellen, zerstört die Lymphozyten und Makrophagen in der Epidermis und Dermis (Amor et al. 2010). Cyclosporin A kann bei therapieresistenten Fällen in einer Dosis von 3-6 mg / kg pro Tag als Monotherapie oder in Kombination mit Kortikosteroiden verwendet werden. Als Nebenwirkungen wurden Pankreatitis, Urtikaria, Nephrotoxizität oder Diarrhoe beschrieben (Hertl und Schuler 2002c; Clement et al. 1993; Gupta et al. 1990; Merle et al. 1990; Layton and Cunliffe 1990).

Eine weitere Therapiemöglichkeit ist die intravenöse Verbreitung von Immunglobulinen (IVIG). Eine wirksame Dosierung von IVIG kann mit 400 mg / kg pro Tag über 5 Tage erreicht werden bei Darreichungsintervallen zwischen 4 und 6 Wochen als Monotherapie oder zusammen mit Kortikosteroiden bzw. mit einem weiteren Adjuvants. Als Initialtherapie haben IVIG einen guten Effekt, führen aber zu keiner langfristigen Besserung (Hertl und Schuler 2002c; Gourgiotou et al. 2002; Segura et al. 2007; Campos et al. 2006; Harman and Black, 1999; Mohr et al. 1995).

Rituximab kann auch bei schweren Fällen wirksam sein. Rituximab stellt einen chimären monoklonalen Antikörper gegen CD20 auf B-Zellen dar (Schmidt et al. 2006, Sadler et al. 2007). Die Therapie mit Rituximab führt zum Abbau der pathogenen B-Zellen; der therapeutische Effekt kann bis 12 Monate andauern. Rituximab wird häufig in einer Dosis von

375 mg / m² i.v. wöchentlich in Abständen eines Monats zusätzlich zur immunsuppressiven Standardbehandlung verabreicht (Hertl et al. 2008).

1.7 Ziele dieser Studie

Die Pathogenese der Pemphigoid-Erkrankungen ist zurzeit nur teilweise bekannt. Die Auslösung bullöser Pemphigoide kann jedoch neben anderen Ursachen mit der Einnahme bestimmter Medikamente assoziiert werden (Stavropoulos et al. 2014). Eine Reihe von publizierten Fallberichten und Registerstudien legen nahe, dass die relativ neuen oralen Antidiabetika (DPP-IV Inhibitoren), die oft auch als "Gliptine" bezeichnet werden, Pemphigoid-Erkrankungen und besonders BP auslösen können (Attaway et al, 2014; Bene et al, 2015; Pasmatzi et al, 2011). Von den in Korea erhältlichen DPP-IV-Inhibitoren war Vildagliptin mit dem höchsten Risiko verbunden, insbesondere bei männlichen Patienten (Lee et al. 2019). Ein Absetzen des verdächtigen Medikamentes führte in den beschriebenen Fällen zu einer Reduktion des Hautausschlages.

In der Haut exprimieren viele Zelltypen, einschließlich Keratinozyten, das Protein DPP-IV. Die DPP-IV Sekretion von diesen Zellen kann zur Zytokine-Produktion und zum Kollagenstoffwechsel beitragen (Thielitz et al. 2008); außerdem wurden Proglucagon, GLP-1- und GIP-Rezeptoren in der Hautstruktur beschrieben (List et al. 2006, Skandalis et al. 2012). Des Weiteren können DPP-IV Inhibitoren sowohl die adaptive als auch die angeborene Immunität beeinflussen. Zu diesen Mechanismen gehören der proteolytische Abbau von bioaktiven Molekülen sowie zahlreichen Chemokinen, Zytokinen und Neuropeptiden (Stulc und Sedo 2010), die oft eine entscheidende Rolle in der Pathogenese verschiedener entzündlicher Erkrankungen spielen.

Zusätzlich hat DPP-IV die Fähigkeit, die Akkumulation von Neutrophilen zu vermindern (Herlihy et al. 2013). Nach Sarah et al. stellt DPP-IV die Anhäufung sowohl von Human- als auch von Maus-Neutrophilen ein, beziehungsweise rufen DPP-IV Inhibitoren keine Verringerung der Akkumulation von Neutrophilen hervor. Basierend auf dieser Beobachtung haben Herlihy et al. die Schwere der Arthritis bei Mäusen erforscht, die intraartikulär mit löslichem DPP-IV injiziert wurden. Die Ergebnisse ergaben, dass DPP-IV sowohl die Entzündungszeichen beim Mausmodell abschwächen als auch die Schwere der Arthritis verringern kann (Herlihy et al. 2015).

Ziel unserer Studie ist es, festzustellen, ob DPP-IV Inhibitoren bullöse Pemphigoide induzieren können. Zusätzlich werden die bestimmten molekularen Mechanismen untersucht, die mit der Auslösung pemphigoider Erkrankungen von DPP-IV Inhibitoren assoziiert sind. Dies

erfolgte durch ein Autoantikörpertransfer-Mausmodell des bullösen Pemphigoid-like Subtyp der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA), da EBA Pemphigoide Erkrankungen simuliert. Darüber hinaus wurde das Gefrierschnittmodell sowie ein *ex-vivo* Modell der bullösen Pemphigoide verwendet. Außerdem können sowohl reaktive Sauerstoffradikale (ROS) von aktivierten Granulozyten mithilfe Chemilumineszenz im ROS-Release, als auch die Genexpression von IL6 und IL8 mithilfe des ELISA und der qPCR untersucht werden. Diese Methoden simulieren die Abfolge der Ereignisse, die zur Blasenbildung der Haut bei bullösem Pemphigoid führen. Die kombinierte Verwendung dieser Methoden kann die Rolle der DPP-4 in der Effektorphase der Pathogenese von Pemphigoid Erkrankungen aufklären.

2. Material und Methoden

2.1. Gefrierschnittmodell

Die Effekte der DPP-IV Inhibitoren auf die DES wurden in vitro mit dem Gefrierschnittmodell untersucht. Im Versuch wurden Gefrierschnitte von humaner Haut verwendet, welche in Serum von Patienten mit BP oder in Serum von gesunden Spendern als Kontrolle inkubiert worden sind. Die Seren wurden im Verhältnis 1:2, 1:3 und 1:4 mit PBS verdünnt. Für die Kontrollseren wurden Seren gesunder Spender verwendet, welche keine Hinweise auf eine bullöse Dermatose zeigten. Die Gefrierschnitte wurden für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig wurden Leukozyten von verschiedenen, gesunden Spendern isoliert. Danach wurde der zu testende DPP-Inhibitor Vildagliptin in unterschiedlichen Konzentrationen (1 μ M und 10 μ M) zusammen mit den humanen Leukozyten auf die Gefrierschnitte gegeben. Nach 3 Stunden Inkubationszeit in 37°C wurden die Schnitte gewaschen und Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Am Ende wurden die Präparate am Mikroskop ausgewertet.

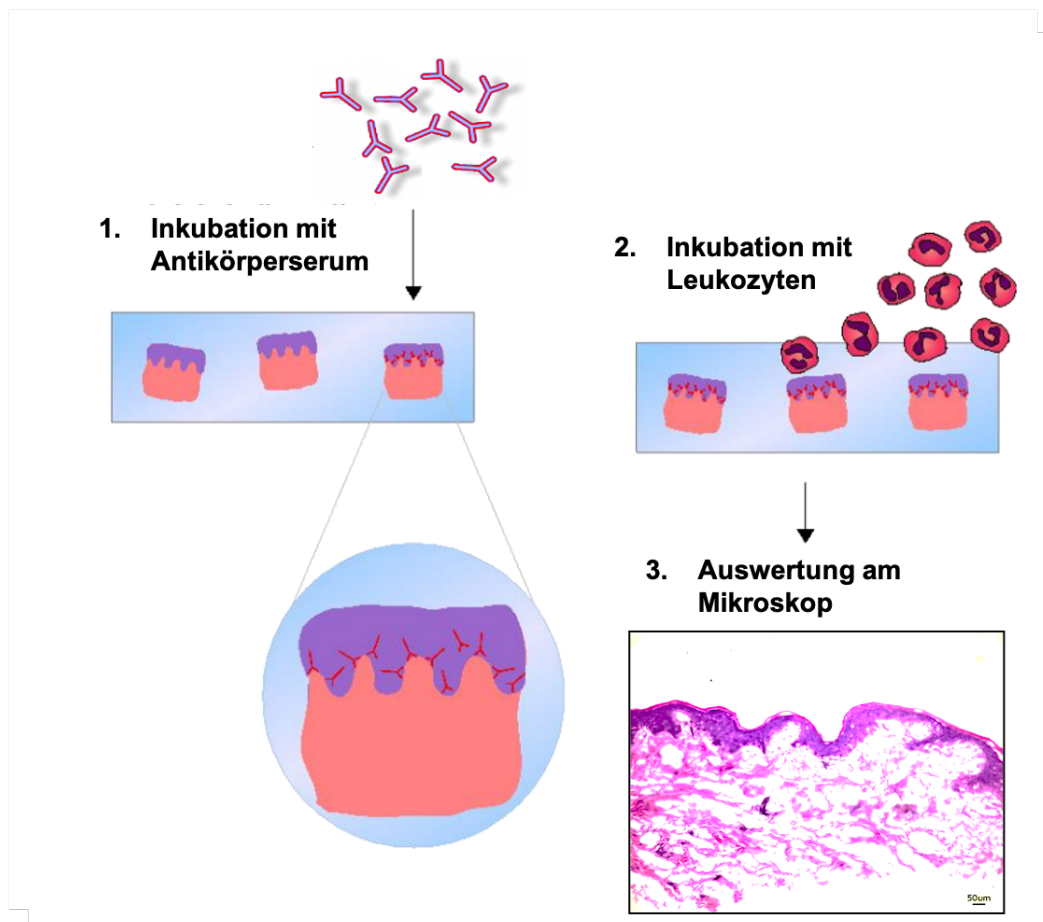


Abbildung 10: Das Prinzip des Gefrierschnittmodells. Gefrierschnitte werden mit Antikörperserum inkubiert (1). Dann wurden isolierte humane Leukozyten zu den Gefrierschnitten hinzugefügt und nochmal inkubiert (2). Die Auswertung der Schnitte wurde am Mikroskop durchgeführt (3).

2.1.1. Leukozytenisolierung

Die Leukozyten wurden aus dem Blut gesunder, freiwilliger Spender gewonnen. Es wurden 40 ml Blut entnommen und mit Heparin antikoaguliert. Die Spender befanden sich in einem Alter zwischen 20 bis 44 Jahren; es nahmen sowohl Frauen, als auch Männer teil. Die Blutentnahme wurde mit einer Butterflykanüle (Safety-Multifly-Kanüle, Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht) und vier 10 ml Röhrchen (S-Monovette-Sarstedt, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) durchgeführt. Dann wurden zwei 50 ml-Röhrchen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) mit 20 ml einer 3% Dextranlösung vorbereitet. Vorher war Dextran 500 (Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe) mit 0,9% NaCl (Natriumchlorid, J.T. Baker, Deventer, Holland) versetzt worden. Die gleiche Menge von Blut wurde in die Röhrchen gegeben und die Blutsuspension wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in zwei Phasen geteilt, von denen die obere Phase die Leukozyten enthielt. Diese Phase wurde vorsichtig mit einer 1000 µL-Pipette (Transferpette® S, BRAND GmbH, Wertheim) in zwei neue 50 ml Röhrchen überführt und für 12 Minuten bei 1200 rpm und 19° C zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg). Im nächsten Schritt wurde der Überstand vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe (Transferpipetten, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) verworfen. Danach wurden 10 ml RPMI (BoWhittaker® Lonza, Verviers, Belgium) mit einer automatischen Pipette (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) den Pellets der Zellen zugegeben und die Lösung resuspendiert. Die Tuben wurden nochmals für 12 Minuten bei 1200 rpm und 19°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann wieder abgesaugt und das Pellet wurde in 20 ml eiskalter 0,2%-NaCl-Lösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) für 20 Minuten resuspendiert und erneut mit 20 ml eiskalter 1,6%-NaCl-Lösung (DeltaSelect GmbH, Dreieich) resuspendiert. Die Lösungen wurden für 12 Minuten bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Nachfolgend wurde der Überstand verworfen und das Pellet wurde in 30 ml RPMI

resuspendiert und für 7 Minuten bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Leukozyten wurden mit 4 ml RPMI resuspendiert.

Die Zellzählung wurde mithilfe von Trypanblau (Sigma Life Science, SIGMA-ALORICH Chemie, Steinheim) durchgeführt. Dafür wurde 10 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau und 440 µl PBS in einem 1,5 ml Tube (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) gemischt. 10 µl aus dieser Suspension wurden in eine Zählkammer (Neubauer-Optik Labor, Assistent, Sondheim) zugegeben und die Zellen wurden unter dem Mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan) in 20-facher Vergrößerung gemessen. Die vitalen Zellen sehen farblos aus. Die Zellen, die nicht vital sind, nehmen den blauen Farbstoff auf und sind so von den vitalen zu unterscheiden. Für die Zellzahl wurden die vier Quadrate der Zählkammer verwendet. Die Zellzahl je Milliliter wurde wie folgt berechnet: Summe der vier Quadrate $\times \frac{1}{4} \times 50 \times 10^4$ Zellen / ml. Die Zellzahl betrug 4 bis $7,5 \times 10^6$ Zellen / ml.

2.1.2. Vorbereitung der DPP-IV Inhibitoren

Als DPP-IV Inhibitor wurde Vildagliptin (Selleck Chemicals, Houston, USA) verwendet. Dieser wird als potentieller Auslöser des BP gehandelt. Außerdem stellt Vildagliptin den stabilsten DPP-IV Hemmer in vitro dar, wodurch er sich für besonders für Inhibitionsstudien eignet (Villhauer et al. 2003). Der Wirkstoff Vildagliptin mit der Summenformel $C_{17}H_{25}N_3O_2$ hat eine molekulare Masse von 303,4g / mol. 5 mg Vildagliptin wurde mit einer elektronischen Waage gewogen und in 1,648 ml sterilem DMSO (Dimethylsulphoxide Hybri-Max®, SIGMA-ALORICH, Steinheim) gelöst, um eine 10 mM Stammlösung zu erhalten. 1 ml Eppendorfgefäße wurden mit jeweils 25 µl von dieser Lösung vorbereitet und bei -80° C gelagert. Für die durchgeführten Experimente wurden Konzentrationen von 1 µM und 10 µM verwendet. Für die 1 µM Konzentration des Vildagliptins wurden 5 µl der Stocklösung mit 495 µl RPMI verdünnt und 20 µl von dieser Lösung mit 2 ml von der vorbereiteten Zellsuspension vermischt. Für die 10 µM Konzentration des Medikamentes wurden 5 µl der Stammlösung mit 45 µl RPMI gemischt und danach 20 µl von dieser Lösung mit 2 ml der Zellsuspension verdünnt. Von den Negativkontrollen wurde die vorbereitete Zellsuspension ohne den Einsatz von DPP-IV Inhibitoren benutzt.

2.1.3. Vorbereitung der Gefrierschnitte

Die Gefrierschnitte wurden aufgetaut und vor dem Experiment wurde die Qualität der Hautschnitte unter dem Mikroskop bewertet. Zwischen den einzelnen Hautschnitten wurde anschließend ein Strich mit einem Ölstift gezogen. Danach wurden 80µl von den entsprechenden Positiv- und Negativseren in den Verdünnungen 1:2, 1:3, 1:4 auf die Hautschnitte aufgetragen. Die vorbereiteten Hautschnitte wurden dann in einer schwarzen Feuchtigkeitskammer (Werner Hassa GmbH, Lübeck) für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ im Begasungsbrutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen) inkubiert. Es wurde auch Positiv- und Negativseren in den Verdünnungen 1:8 und 1:16 im Gefrierschnittmodell getestet und die Verdünnungen mit der höchsten Spaltbildung (1:2, 1:3 und 1:4) ausgewählt. Dann wurden die Hautschnitte in PBS für 5 Minuten gewaschen und jeder Gefrierschnitt mit einem Objektträger (Microscope slides, Th. Geyer Gruppe, Hamburg) abgedeckt, um eine Injektionskammer für die Zellsuspension herzustellen. Danach wurde Tesafilm an beiden Seiten der Gefrierschnitte aufgebracht, wodurch sich Kammern von etwa 1mm Höhe ergaben. Die beiden Objektträger wurden mithilfe von Parafilm (BEMIS Flexible packaging, Neenah, USA) aneinander fixiert und in die entstandene Kammer wurden jeweils 700 µl der vorbereiteten Zellsuspension ohne Wirkstoffe oder mit Vildagliptin in entsprechender Konzentration injiziert. Dann wurden die Schnitte für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Begasungsbrutschrank inkubiert. Anschließend wurden Parafilm und die oberen Objektträger entfernt und die Schnitte vorsichtig mit PBS für circa 15 Minuten gewaschen, bis mikroskopisch die Hautschnitte frei von Zellen waren.

2.1.4. Färbung der Schnitte

Die Färbung wurde mit Hämatoxylin und Eosin (H-E-Färbung) durchgeführt. Die Schnitte wurden für 5 Minuten in Formalin fixiert und danach mithilfe von Leitungswasser gewaschen. Die Schnitte wurden 4 Minuten mit der Kernfärbung nach Papanicolaou gefärbt und wieder mit Leitungswasser gewaschen. Danach wurden die Schnitte 20 Sekunden in Ethanol gelegt und nochmals gespült. Im folgenden Schritt wurden die Schnitte für 10 Sekunden in Ammoniakwasser gestellt, danach abgespült und 1-2 Minuten mit Eosin gefärbt. Folglich wurden die Schnitte in einer Alkohollösung und Xylol dehydriert. Die Schnitte wurden mit Deckgläschen abgedeckt. Abschließend wurden die gefärbten und eingedeckten Schnitte

unter dem Mikroskop (Keyence Mikroskope BZ-9000E, Keyence Deutschland GmbH) in 10facher und 20facher Vergrößerung ausgewertet und fotografiert.

2.2. ROS-Release

Die Effekte von DPP-IV Inhibitoren auf die Bildung von ROS wurden mithilfe des ROS-Release untersucht.

2.2.1. Isolierung von neutrophilen Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten wurden von gesunden, freiwilligen Spendern aus 36 ml Blut gewonnen, das mit EDTA antikoaguliert wurde. Die Spender waren zwischen 22 und 44 Jahren. Die Spender waren zwei Frauen und ein Mann, und die Abnahme erfolgte mit einer Butterflykanüle (Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht) und vier 9 ml-Röhrchen (Monovette EDTA, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht), die mit EDTA zur Antikoagulation vorbereitet waren. Das ganze ROS-Release wurde unter einer Sterilwerkbank (laminar Hood, NuAire, Plymouth, Minnesota, USA) durchgeführt. Danach wurden 6 ml Polymorphprep (PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg) mit einer automatischen Pipette in sechs 15 ml-Tuben zugesetzt. Dann wurde das entnommene Blut vorsichtig in die Röhrchen überführt, wobei in jedem Röhrchen das Polymorphprep mit jeweils 6 ml Blut überlagert wurde. Die Röhrchen wurden 35 Minuten bei 1600 rpm und bei Raumtemperatur zentrifugiert, die Bremse der Zentrifuge zur Erhaltung der Phasentrennung deaktiviert. (Zentrifuge 5810R, Eppendorf). Nach dem Zentrifugieren bildeten sich vier Zellbanden in jedem Röhrchen aus. Das oberste Band enthielt die mononukleären Zellen, wie Lymphozyten und Monozyten, wohingegen sich die für die Versuche benötigten Granulozyten im zweiten Band sammelten. Deswegen wurde anschließend das oberste Band vorsichtig mit einer automatischen Pipette (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) mit einem 5 ml-Aufsatz (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) abgenommen und verworfen und das zweite Band mit Granulozyten vorsichtig abgenommen und in ein 50 ml-Röhrchen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) überführt. In dieser Granulozytensuspension wurde 5 ml Halbmedium (RPMI 1640 verdünnt mit sterilem ddH₂O im Verhältnis 1:1) zugefügt und mit RPMI (Lonza RPMI 1640 mit L-Glutamin, BioWhittaker® Lonza, Verviers, Belgium) bis 50 ml gefüllt. Das Röhrchen wurde danach für 10 Minuten bei 1400 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und 3 ml Lysepuffer (LPS-freies D-PBS verdünnt mit sterilem ddH₂O im Verhältnis 1:5) wurden mit der automatischen Pipette mit 5 ml-Aufsatz (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) dem Pellet zugefügt und für 30 Sekunden resuspendiert. Anschließend wurde die Lösung mit RPMI auf 50 ml

aufgefüllt. Die Tube wurde nochmals für 10 Minuten bei 1400 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt; das Pellet wurde darauffolgend mit 20 ml Chemilumineszenzmedium (CL-Medium, RPMI 1640 ohne Phenolrot (GENAXXON Bioscience GmbH, Ulm), welches mit HEPES versetzt war (25 mM HEPES, Biochrom GmbH, Berlin), resuspendiert. Die Lösung wurde ein letztes Mal für 10 Minuten bei 1400 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, verworfen und das Pellet mit isolierten Granulozyten mit 5 ml CL-Medium resuspendiert.

Für die Zellzählung wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl CL-Medium in einem 1 ml-Röhrchen verdünnt. Aus dieser Suspension wurden 10 µl in eine Zählkammer injiziert und die Zellen wurden unter dem Mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan) in 20-facher Vergrößerung gemessen. Alle vier Quadrate der Zählkammer wurden für die Zellzahl verwendet. Die Zellzahl je Milliliter wurde wie folgt berechnet: Summe der vier Quadrate $\times \frac{1}{4} \times 10 \times 10^4$ Zellen / ml. Die Zellzahl betrug 4 bis $7,5 \times 10^6$ Zellen / ml und je nach ermittelter Zellzahl erfolgte eine weitere Verdünnung der Granulozytensuspension mit CL-Medium, sodass je 100 µl eine Anzahl von 100.000 Zellen erreicht würde.

2.2.2. Vorbereitung von DPP-IV Inhibitoren und DMSO

Für den Versuch wurden die gleichen Konzentrationen Vildagliptin (Selleck Chemicals, Houston, USA) wie für die Gefrierschnitte verwendet. Für die 1 µM Konzentration von Vildagliptin wurden 5 µl von Stocklösung mit 495 µl CL-Medium verdünnt und 10 µl von dieser Lösung mit 1 ml von der vorbereiteten Zellsuspension in einer 15 ml-Tube (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) vermischt. Für die 10 µM Konzentration des Medikamentes wurden 5 µl von Stammlösung mit 45 µl CL-Medium gemischt und danach 10 µl von dieser Lösung mit 1 ml von der Zellsuspension in einem 15 ml-Röhrchen verdünnt. Als Kontrollen wurden die vorbereitete Zellsuspension mit einer Mischung von Dimethylsulfoxiden (DMSO, SIGMA-ALDRICH, Steinheim) benutzt. Für die Vorbereitung von DMSO wurden 5 µl von Stocklösung des DMSO mit 495 µl CL-Medium verdünnt und 10 µl dieser Lösung wurden mit 1 ml von der Zellsuspension auch in einem 15 ml-Röhrchen vermischt. Anschließend wurde 1 ml von der

Zellsuspension in ein 15 ml- Rörchen hinzugefügt und die vier 15 ml- Rörchen für eine Stunde bei 37° C und 5% CO₂ im Begasungsbrutschrank inkubiert.

Um die Ergebnisse von DPP-IV Inhibitoren zu untermauern, wurde auch Sitagliptin als ein alternativer Wirkstoff der DPP-IV Inhibitoren untersucht. Sitagliptin als DPP-IV Inhibitor wurde häufig für die Behandlung von Diabetes Mellitus gewählt. Der Wirkstoff Sitagliptin mit der Summenformel C₁₆H₁₅F₆N₅O.H₃PO₄.H₂O hat eine molekulare Masse von 523,32 g/ mol. Dafür wurden 2 mg Sitagliptin (Selleck Chemicals, Houston, USA) mit 382µl DMSO verdünnt. Folglich war die Konzentration der Stocklösung 10 mM. 1 ml Eppendorfgefäße wurden mit jeweils 15 µl von dieser Lösung vorbereitet und bei -80° C gelagert. Sitagliptin wurde in den gleichen Konzentrationen wie Vildagliptin (1 µM und 10 µM) verwendet. Für die 1 µM Konzentration von Sitagliptin wurden erneut 5 µl von Stocklösung mit 495 µl CL-Medium verdünnt und 10 µl von dieser Lösung mit 1 ml von der vorbereiteten Zellsuspension in einer 15 ml-Tube vermischt. Für die 10 µM Konzentration des Wirkstoffes wurden 5 µl von Stammlösung mit 45 µl CL-Medium gemischt und danach 10 µl von dieser Lösung mit 1 ml von der Zellsuspension in einem 15 ml - Rörchen verdünnt. Anschließend wurden die Proben wie in dem Experiment mit Vildagliptin vorbereitet und für 1 Stunde bei 37° C und 5% CO₂ im Begasungsbrutschrank inkubiert.

2.2.3. Durchführung des ROS-Release

Die Vorbereitung einer Mikrotiterplatte (Costar® Assay Plate, 96 well, Corning Incorporated, NY, USA) erfolgte durch Coating mit NC16A-Antigen. Dafür wurde die vorliegende Antigenlösung mit einem Coatingpuffer für ROS im Verhältnis 1:620 verdünnt. Der Coatingpuffer wurde vorher vorbereitet. Danach wurden jeweils 200 µl der verdünnten Lösung in jedes Well der Platte pipettiert und bei 4° C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit 300 µl sterilem PBS (LPS-freies D-PBS, *Invitrogen* GmbH, Darmstadt) zur Entfernung nicht gebundener Antigene gewaschen und mit 200 µl Blockingpuffer (FCS wurde mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt) je Well geblockt. Im folgenden Schritt wurde die Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Sterilwerkbank inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut dreimal mit 300 µl sterilem PBS gewaschen. Dann wurden 200 µl der Kaninchen-Anti-Human-Serumalbumin Antikörper (SIGMA-ALORICH,

Darmstadt), die vorher mit PBS im Verhältnis 1:400 verdünnt wurden, in eine Hälfte der Platte pipettiert und in die übrigen Wells wurden 200 µl PBS als Negativkontrolle pipettiert. Die Platte wurde nochmals für 3 Stunden bei Raumtemperatur unter der Hood inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte erneut mit PBS gewaschen. Die jeweiligen Lösungen aus Zellsuspension ohne DPP-IV Inhibitor (Vildagliptin oder Sitagliptin) oder mit DPP-Inhibitor in unterschiedlicher Konzentration oder mit DMSO wurden anschließend mit jeweils 50 µl Luminollösung versetzt. Luminollösung wurde vorher mit 2 mg Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion, SIGMA-ALDRICH, Darmstadt) vorbereitet, was in 8 µl NaOH gelöst wurde und mit 1 ml CL-Medium verdünnt. Danach wurden 200 µl der unterschiedlichen Proben als Duplikat sowohl in den Wells, die mit der Kaninchen-Anti-Human-Serumalbumin Antikörper inkubiert wurden, als auch in den Wells, die mit dem PBS als Negativkontrolle inkubiert wurden, pipettiert. Die Platte wurde sofort in einen Infinite M200 PRO ELISA Reader (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) zur photometrischen Auswertung gestellt. Die optische Dichte (OD) wurde bei 425 nm und 37° C in 60 Minutenzyklen gemessen. Die Daten wurden als relative Lichteinheiten dargestellt. Die Auswertung der gemessenen Werte und die statistische Auswertung erfolgten mit dem GraphPad Prism 5.

2.3. PMNs Stimulation

Für die Isolierung der polymorphkernigen Leukozyten (PMNs) wurde das gleiche Verfahren wie für die Isolierung der neutrophilen Granulozyten angewendet. Die Platte wurde wie die Platte für ROS Release vorbereitet und für 3 und 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Begasungsbrutschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig mit einer 1000 µL Pipette (Transferpette® S, BRAND GmbH, Wertheim) in zwei 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt und die Zellen jedes Wells wurden mit 1 ml Trizol Reagenz (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) versetzt, was zur Extraktion von RNA notwendig ist. Schließlich wurden die Eppendorfgefäße bei -80° C gelagert.

2.4. Durchflusszytometrie

Die Zellen, die nach 3 und 24 Stunden Stimulation mit Vildagliptin keine Apoptose oder Nekrose erlitten, wurden mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Durch diese Methode soll nachgewiesen werden, ob Vildagliptin in den Konzentrationen von 1 μ M und 10 μ M zellschädigend ist.

2.4.1. Durchführung der Durchflusszytometrie

Eine Zahl von 4×10^5 Zellen, die während der PMNs Stimulation für 3 und 24 Stunden inkubiert wurde, wurde mit einer 1 ml-Pipette resuspendiert und in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäße gesammelt. Danach wurden die Eppendorfgefäße für 4 Minuten bei 2000 rpm und 4° C inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer 1 ml-Pipette abgesaugt und verworfen; jedes Eppendorfgefäß wurde mit 100 μ L Bindungspuffer (PromoCell, Heidelberg, Germany), 1 μ L Annexin V-FITC (PromoCell, Heidelberg, Germany) und 1 μ L Propidium Iodide (PI) (PromoCell, Heidelberg, Germany) gefüllt. Die Proben wurden danach für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die jeweilige Probe in Reagenzgefäße transportiert und 200 μ l von einem FACS-Puffer (3% BSA in 100 ml DPBS pH 7.2) wurden jedem Reagenzgefäß hinzugefügt. Dann wurden die lebenden Zellen durch eine FACS-Calibur (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) gemessen. Die Anregung für beide Fluorophore (FITC und PI) lag bei 488 nm. Die FITC-Fluoreszenz wurde auf dem FL1 Sensor erfasst, die PI-Färbung auf dem FL2 Sensor. Die Auswertung der gemessenen Werte erfolgte mit FlowJo V10.

2.5. ELISA für IL8 und IL6

Mithilfe des ELISA wurden die Effekte der DPP-IV Inhibitoren zur Freigabe von IL8 und IL6 aus PMNs untersucht. Sowohl IL6, als auch IL8 spielen eine wichtige Rolle auf der Effektor-Phase des BP und beide können durch ELISA nachgewiesen werden.

2.5.1. Durchführung des ELISA

Zunächst erfolgte die Vorbereitung einer 96 Wells-Plate (Costar® Assay Plate, 96 Well, Corning Incorporated, NY, USA) durch Coating mit Capture-Antikörper (BioLegend, Pacific Heights Blvd, San Diego, CA). Dafür wurden die Capture Antikörper in Coatingpuffer für ELISA im Verhältnis 1:200 verdünnt und jeweils 100 µl der verdünnten Lösung in jedes Well der Platte pipettiert. Coatingpuffer wurde vorher mit 8,4g NaHCO₃ (Sodium hydrogen Carbonate, Merck KGaA, Darmstadt), 3,56g Na₂CO₃ (Sodium Carbonate Merck KGaA, Darmstadt) und 1 L entionisiertem Wasser vorbereitet; der pH-Wert wurde auf 9,5 eingestellt. Danach wurde die Platte bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Platte viermal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen, um die überflüssigen, nicht gebundener Antikörper zu entfernen. Der Waschpuffer wurde vorher mit 250 µl Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) in 500 ml PBSx1 (pH: 7,2) vorbereitet. Dann wurde je Well mit 200 µl Assay Diluent geblockt und die Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch inkubiert. Für das Assay Diluent wurden vorher 0,5 g Albumine (Albumin Fraktion V, biotinfrei, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) mit 50 ml PBS für ELISA (8 g NaCl, 1,16 g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄), und 0,2 g KCl mit 1 L Wasser gemischt; der pH wurde auf 7,4 eingestellt). Anschließend wurde die Platte erneut viermal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Dann wurden je Well 100 µl von der jeweiligen IL6- oder IL8-Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen von 15,6 pg / ml, 31,5 pg / ml, 62,5 pg / ml, 125 pg / ml, 250 pg / ml, 500 pg / ml und 1000 pg / ml oder 100 µl von den Proben, die bei -80° C gelagert wurden, pipettiert und die Platte für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch inkubiert. Danach wurde die Platte erneut viermal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und je Well wurden 100 µl vom Nachweis-Antikörper pipettiert. Nachweis-Antikörper wurde wie folgt vorbereitet: Nachweis-Antikörper wurde in Assay Diluent im Verhältnis 1:200 verdünnt. Die Platte wurde nochmal für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch inkubiert. Anschließend wurde die Platte viermal mit Waschpuffer gewaschen und mit 100 µl Avidin-HRP (Avidin-HRP Lösung wurde in Assay Diluent im Verhältnis 1:1000 verdünnt) für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch inkubiert. Danach wurde die Platte fünfmal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und je Well mit 100 µl TMB-Substratlösung (1-Step™ Ultra TMB-ELISA Thermo Scientific, Rockford, USA) für circa 15 Minuten im Dunkeln inkubiert, bis sich die Farbe in den betreffenden Wells entwickelte. Dann wurden 100 µl

Sulfuric acid 25% (Merck KGaA, Darmstadt) in jedes Well hinzugefügt und die Platte wurde sofort in den ELISA-Reader (Infinite M200 PRO, TECAN) gestellt. Die OD wurde bei 425 nm und 37° C in zwei Zyklen gemessen. Als Leerwertkontrolle diente die OD von CL-Medium. Diese wurde zur Vorbereitung aller Proben verwendet. Die Auswertung der gemessenen Werte als auch die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5.

2.6. Quantitative PCR

Mithilfe der quantitativen PCR wurde die Quantifizierung von IL8 aus PMNs untersucht, die vorher mit DPP-Inhibitor stimuliert wurden. Quantitative PCR ist auch eine hilfreiche Methode, um die Freigabe von IL8 nachzuweisen.

2.6.1. RNA-Isolation

Für die quantitative PCR wurden die Proben verwendet, die mit Trizol Reagenz zur Extraktion von RNA bei -80°C gelagert wurden. Für diese Methode wurden Nuklease-freie Eppendorfgefäße und Pipettenspitzen verwendet. $200\ \mu\text{l}$ von Chloroform (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) wurden in jedes Eppendorfgefäß hinzugefügt und jedes Eppendorfgefäß wurde für 15 Sekunden mit einem Vortex durchmischt. Die Proben wurden für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 15 Minuten bei $1200\ \text{g}$ und 4°C zentrifugiert. Dann wurde jede Lösung in 3 Phasen eingeteilt. Die Unterphase ist die Phenol-Chloroform Phase, die eine rote Farbe hatte, dazwischen gab es eine Interphase und die obere Phase war eine farblose wässrige Phase, die RNA enthielt. Die obere Phase wurde vorsichtig in neue Eppendorfgefäße gesammelt, und $500\ \mu\text{l}$ Isopropanol (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) wurden jeder Probe hinzugefügt. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße für 10 Minuten bei $1200\ \text{g}$ und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und verworfen und das RNA-Pellet mit $1\ \text{ml}$ Ethanol-70% (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) gewaschen. Die Proben wurden erneut für 5 Minuten bei $7500\ \text{g}$ und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, und die RNA-Pellets wurden nochmals mit $1\ \text{ml}$ Ethanol-75% gewaschen. Die Eppendorfgefäße wurden zum letzten Mal für 5 Minuten bei $7500\ \text{g}$ und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die RNA-Pellets für 5-10 Minuten getrocknet. Im nächsten Schritt wurden im jeweiligen Eppendorfgefäß $25\ \mu\text{l}$ DEPC behandeltem H_2O mit einer $100\ \mu\text{l}$ Pipette hinzugefügt und die Pellet mit der Pipette resuspendiert.

Im Anschluss wurde die photometrische Auswertung in $10\ \mu\text{l}$ von jeder Probe gemessen, um die Konzentration der RNA festzustellen. Die OD wurde mit NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) bei $260\ \text{nm}$ und $280\ \text{nm}$ gemessen. Absorptionsverhältnis der 260:280 musste über 1,6 sein und 1 OD bei $260\ \text{nm}$ wurde als $40\ \mu\text{g} / \text{ml}$ RNA definiert. Die Konzentrationen der RNA schwankten zwischen 20

ng/ ml und 90 ng/ ml; danach wurden die Proben erneut verdünnt, um für alle Proben die gleiche Konzentration von RNA zu enthalten.

2.6.2. cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurden Synthese-Kits von Thermo Scientific (Darmstadt, Germany) verwendet. In einem Eppendorfgefäß wurde die folgende Lösung für jeweilige 5 µl RNA vorbereitet: 1 µl oligo (dT)₁₈ primers, 6 µl Nuklease-freie H₂O, 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl), 2 µl 10 mM dNTP Mix und 1 µl RevertAid M-MuLV RT (200 U/µl). Die Proben wurden sofort in einem Mastercycler ep realplex (Eppendorf AG, Hamburg) gestellt und für 60 Minuten bei 42° C und für 5 Minuten bei 25° C inkubiert. Anschließend wurden sie erneut für 60 Minuten bei 42° C und schließlich für 5 Minuten bei 70° C inkubiert. Die Proben wurden danach bei -20° C gelagert.

2.6.3. qPCR

Die Proben von c-DNA Synthese wurden am Anfang mit Nuklease-freiem H₂O im Verhältnis 1:10 verdünnt. Menschliche Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als interne Kontrolle verwendet. Master Mix für IL8 wurde für die jeweilige Probe mit 1 µl vorwärts-Primer für IL8 (Thermo Scientific, Darmstadt, Germany), 1 µl Reserve-Primer für IL8 (Thermo Scientific, Darmstadt, Germany) und 10 µl SYBR master mix (von Biosystems-Life technologies, Austin, TX, USA) vorbereitet. Für GAPDH-Master Mix wurden für jede Probe beziehungsweise 1 µl vorwärts-Primer für GHPDH mit 1 µl Reserve-Primer für GAPDH und 10 µl SYBR master mix gemischt. 8 µl von jeweiliger Probe wurden in eine Mikrotiterplatte (MultiPLY® PCR Platten aus Polypropylen, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) pipettiert und anschließend die 12 µl von Master Mix Lösung für IL8 oder GAPDH pipettiert. Echtzeit-PCR wurde doppelt für beide Gene durchgeführt. Die Platte wurde sofort in einen Thermocycler (applied biosystems by life technologies, 2720 Thermal Cycler) gestellt. Das für die PCR gewählte Zyklusprogramm waren initiale 2 Minuten bei 50° C, danach weitere 2 Minuten bei 95° C, dann für 15 Sekunden bei 95° C und für 60 Sekunden bei 60° C. Die letzten beiden

Schritte wurden für 40 Zyklen wiederholt. Die Daten wurden als Delta-Ct-Werte der IL8-Gene in Bezug auf GAPDH dargestellt. Der Durchschnitt jeder Doppelbestimmung wurde berechnet; danach wurde der Unterschied der Genexpression in jeder gepaarten Probe wie folgt ermittelt: Genexpression ΔCt (Ct-GAPDH – Ct-IL8) = Durchschnitt von GAPDH-Expression (Ct-GAPDH) minus Durchschnitt IL8-Expression (Ct-IL8). Schließlich wurden die Werte als $2^{\Delta Ct}$ ausgedrückt.

2.7. Autoantikörpertransfer Mausmodell der EBA

Die Effekte der DPP-IV Inhibitoren wurden zusätzlich durch ein Tierversuchsmodell untersucht, um die Auswirkungen der DPP-IV Inhibitoren an der Schwelle der Effektorzellrekrutierung und Aktivierung in der Haut zu erforschen. Als Tierversuchsmodell wurden Experimente mit einem Autoantikörpertransfer-Mausmodell (passiv) der EBA durchgeführt. Die Mausmodelle von EBA wurden als ein prototypisches Beispiel von bullöser Pemphigoide gewählt. Dieses ist ein zuverlässiges Model und wurde in der Klinik für Dermatologie in Lübeck etabliert (Bieber et al. 2010). Für die Tierversuchen wurde Genehmigung zur Durchführung von dem Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume am 23. April 2015 mit Zeichen V 242-7224.122-5(41 -3/15) erteilt.

2.7.1. IgG-Reinigung und Isolierung von spezifischem mCol 7c IgG

Für das passive Mausmodell von EBA wurden erst die Autoantikörper für EBA isoliert. Dafür wurde Serum von Kaninchen, die vorher gegen Typ-VII Kollagen von Mäusen immunisiert wurden, abgenommen, und der spezifische Teil von IgG, mCol7c, wurde isoliert. Zwei Säulen von Protein G-Agarose-Harz (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) wurden für die IgG-Reinigung verwendet und alle Lösungen wurden gefiltert (folded Filters, GE Healthcare Life Sciences Whatmat, Germany). Das enthaltende Ethanol wurde verworfen und die Säulen wurden zweimal mit PBS im Volumen der Säule gewaschen. Danach wurde das Serum (Eurogentec, Seraing, Belgium) zu den Säulen hinzugefügt und das Serum mit PBS verdünnt, bis das Volumen der Lösung in jeder Säule gleich dem mittleren Volumen jeder Säule (circa 50-70 ml) wurde. Die Säulen wurden für 1 Stunde bei 4° C auf einem Schütteltisch inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt der Säulen verworfen und die Säulen wurden mit PBS gewaschen, bis die Konzentration der enthaltenden Lösung photometrisch 0,05 wurde. Ein konisches Erlenmeyerkolben wurde gleichzeitig mit 5-8 ml 1 M Tris Puffer (pH 9,0) (121,10 g Tris wurde in 1 L dH₂O verdünnt und pH-Wert wurde auf 9,0 mithilfe NaOH eingestellt) vorbereitet und die Elution von IgG wurde mithilfe von 0,1 M Glycin-Puffer (7,507 g Glycin wurde in 1 L dH₂O verdünnt und pH wurde auf 2,8 eingestellt) durchgeführt. Die Elution von Glycin-Puffer-IgG wurde in dem konischen Erlenmeyerkolben gesammelt, bis die

Konzentration der Elution photometrisch $<0,01$ wurde. Dann wurden die Säulen mit NaCl mit einem Volumen gleich dem Volumen der Säulen gewaschen und dann mit PBS im gleichen Volumen gewaschen. Die Säulen wurden mit 20% Ethanol bei 4°C gelagert; die IgG-Elution wurde in 4 Cellulose-Dialyseschlauch (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) bei Polyethylenegluco 20000 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) für ungefähr 3 Stunden gelagert bis die IgG-Elution im Cellulose-Dialyseschlauch die Hälfte des ursprünglichen Volumens aufwies. Danach wurde die IgG-Elution in einem Cellulose-Dialyseschlauch gesammelt und der Filter in PBS bei 4°C für einen Tag gelagert.

Für die Isolierung von spezifischen mCol 7c IgG wurde eine spezifische „anti mcol 7c Säule“ verwendet, die vorher in 20% Ethanol gelagert wurde. Das enthaltende Ethanol wurde erst verworfen und die Säule mit PBS mit einem Volumen gleich dem Volumen der Säule gewaschen. Dann wurde die IgG-Elution der Säule hinzugefügt und die Säule für 20 Minuten bei 4°C auf einem Schütteltisch inkubiert. Danach wurde die enthaltende IgG-Elution in einem konischen Erlenmeyerkolben mit Label „Zyklus 1,“ gesammelt. Die Säule wurde mit PBSx1 pH 7,2 mit einem Volumen gleich dem Volumen der Säulen gewaschen. Dann wurde PBS verworfen und 850 mM NaCl mit PBSx1 und 1% Triton hinzugefügt. Danach wurde die vorherige Lösung verworfen und PBSx1 hinzugefügt, bis die Konzentration der Lösung photometrisch $<0,01$ erreichte. Ein konisches Erlenmeyerkolben wurde mit 5-8 ml 1 M Tris Puffer (pH 9,0) vorbereitet und die Elution von spezifischem mcol7c IgG mithilfe 0,1 M Glycin-Puffer durchgeführt. Die Elution von Glycin-Puffer-IgG wurde in dem Erlenmeyerkolben gesammelt, bis die Konzentration der Elution photometrisch $<0,01$ erreichte. Der pH-Wert der spezifischen IgG-Elution wurde danach mithilfe 1 M Tris-Base (pH: 9) auf den pH-Wert 7,2 eingestellt. Die Säule wurde mittels 20 mM Tris (pH 7,2) gewaschen und anschließend mit 20 mM Tris und 0,5 M NaCl (pH auf 7,2) gewaschen. Dann wurde die Säule mit PBS x1 (pH 7,2) gewaschen und das gleiche Verfahren wurde dreimal (insgesamt 3 „Zyklen“) durchgeführt. Nach dem dritten „Zyklus“ wurde die Säule mit 20% Ethanol bei 4°C gelagert, bis Ethanol die Hälfte des ursprünglichen Volumens der Säule erreicht. Die Elution von spezifischem mcol7c IgG erfolgte danach in zwei 50 ml Röhrchen (Amicon Ultra-15 (30kDa) Merck Millipore, Darmstadt); die Röhrchen wurden danach für 30 Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der den spezifischen Teil des IgG mcol7c enthielt, wurde in einem 50 ml Röhrchen gesammelt und die Konzentration der IgG-Lösung wurde mittels NanoDrop 2000c

Spectrophotometer gemessen. Der gemessene Wert der Konzentration war 0,6 µg / ml und wurde bei 4° C gelagert.

2.7.2. Durchführung des EBA Mausversuches

Das passive Mausmodell der EBA wurde zweimal durchgeführt. Jedes Experiment enthielt zwei Versuchsgruppen. Die erste Gruppe enthielt 5 C57BL/6-Mäuse, die mit Vildagliptin behandelt wurden und eine Kontroll-Gruppe, die auch 5 C57BL/6-Mäuse enthielt und mit der gleichen Menge von PBS als Kontrolle behandelt wurden. Für die Vorbereitung des Vildagliptins wurden 22,5 µl des Wirkstoffes mit 1120 µl sterilem Wasser verdünnt; 1,5 ml Eppendorfgefäße wurden mit 70 µl von dieser Lösung befüllt und bei -80° C gelagert. Vor Anwendung des Medikaments wurden 69 µl der Vildagliptin-Stocklösung (Selleck Chemicals, Houston, USA) mit 483 µl sterilem PBS (LPS-freies D-PBS, gibco life technologies, Paisley, UK) verdünnt und 100 µl von dieser Lösung (äquivalent mit 10 mg / kg Vildagliptin) jeder Maus peroral (p.o.) durch Gavages verabreicht. Jede Maus der Kontrollgruppe empfing 100 µl PBS per Sonde. Die Anwendung des Medikamentes oder des PBS wurde einmal pro Tag durchgeführt. Als „erster Tag“ des Tierversuches (Tag: 0) wurde der Tag definiert, an welchem die Mäuse mit der ersten Anwendung der Autoantikörper injiziert wurden. Zwei Tage vor dem „ersten Tag“ des Autoantikörperversuchs begann die Anwendung des Medikamentes. Am ersten Tag wurde die erste Anwendung der Autoantikörper in den Nacken jeder Maus injiziert. Für jede Anwendung wurden 50 µg / g Körpergewicht verwendet. Da die Autoantikörper-Lösung eine Konzentration von 0,6 µg / ml hatte, wurden für jede Maus 85 µl von der Autoantikörper-Lösung in 15 µl PBS verdünnt und 100 µl dieser Lösung jeder Maus injiziert. An Tag 2 des Versuches wurden jeder Maus weitere 100 µl der Autoantikörper-Lösung in das rechte Vorderbein injiziert. An Tag 4 des Tierversuches wurden jeder Maus 100 µl der gleichen Autoantikörper-Lösung in das linke Hinterbein injiziert. Die klinische Bewertung der Schwere der Erkrankung wurde an den Tagen 0, 5, 7, 10 und 13 durchgeführt. An Tag 13 des Tierversuches wurden die Mäuse getötet und sowohl Blut via Herzpunktion als auch Hautproben der Mausohren von jeder Maus entnommen.

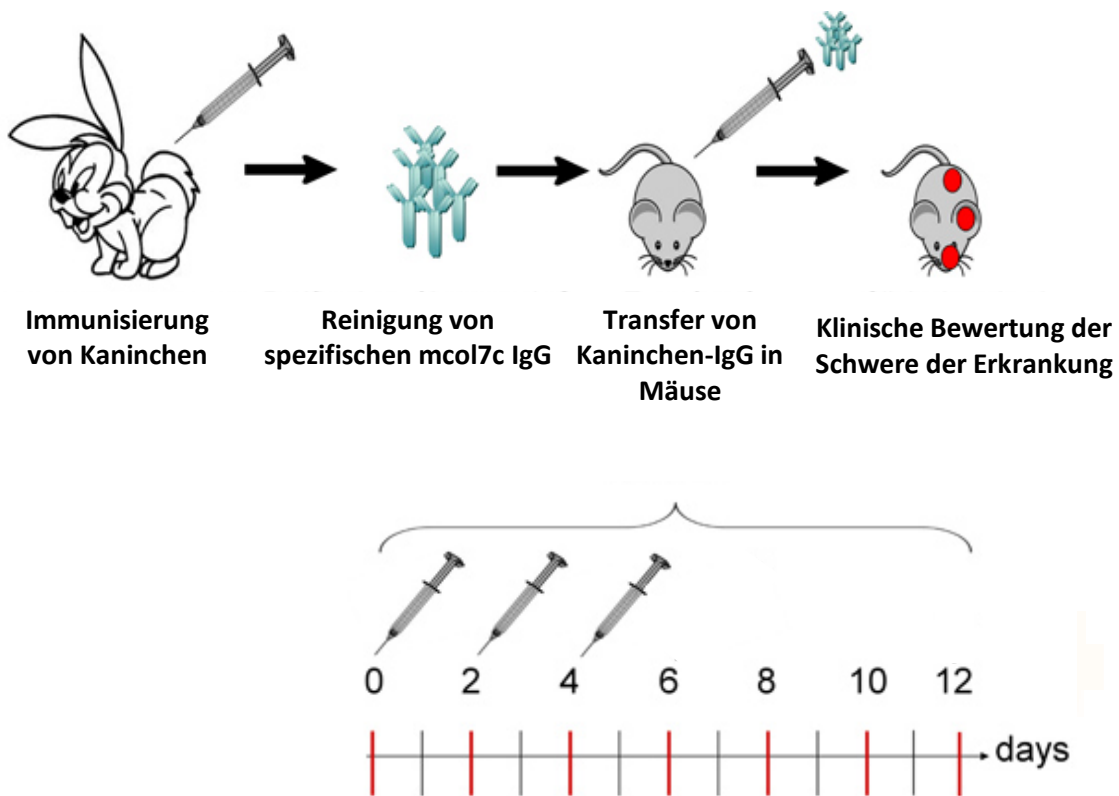


Abbildung 11: Das Prinzip des passiven EBA Mausversuches. Mäuse wurden mit dem spezifischen Teil von IgG, mCol7c an den Tagen: 0, 2, 4 injiziert, welches vorher von immunisierten Kaninchen isoliert wurde. Mäuse wurden einmal pro Tag mit 10mg/kg Vildagliptin durch Gavages behandelt. Klinische Bewertung der Schwere der Erkrankung wurde an den Tagen 0, 5, 7, 10 und 13 durchgeführt. Am Tag: 13 des Tierversuches wurden die Mäuse getötet und Biopsien entnommen.

2.7.3. Direkte Immunfluoreszenz

Direkte Immunfluoreszenz wurde für die Bewertung der IgG-Ablagerung und der Ablagerung von Komplement durchgeführt, da beide eine wichtige Rolle für die Diagnose der bullösen Pemphigoide spielen. Für die direkte Immunfluoreszenz wurden die Gefrierschnitte wie die Gefrierschnitte für das Gefrierschnittmodell (siehe oben) vorbereitet und bei -20 gelagert. Danach wurden die Schnitte für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert; die Fixierung wurde mittels Inkubation mit kaltem Aceton für 10 Minuten bei 4° C durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte für eine kurze Weile getrocknet und dreimal für 5 Minuten in PBS (pH: 7,2) gewaschen. Dann wurden die Schnitten getrocknet und ein Kreis um die jeweilige Hautprobe mit einem hydrophoben Dako-Stift gezogen. Für die Ablagerung von IgG

wurde Alexa Fluor® 594-conjugated Affini Pure Donkey Anti-Rabbit IgG (H + L), (Jackson Immuno Research, Suffolk, UK) verwendet; für die Ablagerung von Komplement wurde mouse anti-mouse C3-FITC (BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Munich) verwendet. Im Detail wurde für die IgG-Ablagerung Donkey Anti-Rabbit IgG mit PBS im Verhältnis 1:500 verdünnt und die jeweilige Hautprobe wurde mit 50µl dieser Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Daneben wurde für die Ablagerung von Komplement Mouse anti-mouse C3-FITC mit PBS im Verhältnis 1:200 verdünnt, und die jeweilige Hautprobe wurde ebenfalls mit 50µl dieser Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte dreimal für 5 Minuten in PBS (pH: 7,2) gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit einer Glasdeckung mithilfe von DAPI Fluoromount-G® (SouthernBiotech, Birmingham, USA) eingedeckt. Schließlich wurden die eingedeckten Schnitte unter dem Mikroskop (Keyence Mikroskope BZ-9000E, Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg) in 10facher und 20facher Vergrößerung ausgewertet und fotografiert.

2.8. Auswertung

Die Auswertung der gemessenen Werte erfolgte mit dem GraphPad Prism 5. Die statistische Auswertung von ROS Release, ELISA und Quantitative Echtzeit-PCR erfolgte mit Kruskal-Wallis, one-way ANOVA Test und die statistische Auswertung des Tierversuches erfolgte mit two-way ANOVA Test.

3. Ergebnisse

3.1. Effekte von DPP-IV Inhibitoren auf die Bildung von ROS im Gefrierschnittmodell

Die Effekte von DPP-IV Inhibitoren auf die Bildung von ROS bei der durch BP-Antikörper induzierten Spaltbildung wurden im Gefrierschnittmodell untersucht. Mit dem Versuch wurde Vildagliptin in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM getestet. Diese wurden aus einer 10 mM Stocklösung durch Verdünnen mit dem Lösungsmittel RPMI hergestellt. Als Negativkontrollen dienten im Gefrierschnittmodell Seren gesunder Spender und als Positivkontrollen Seren von Patienten mit BP. Es ergaben sich so die Versuchsgruppen: Versuchsgruppe I als Negativkontrolle (NK) mit normalen Seren und dem Lösungsmittel RPMI, Versuchsgruppe II und III mit normalen Seren und Vildagliptin in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM , Versuchsgruppe IV und V mit pathologischen Seren und Vildagliptin in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM und Versuchsgruppe VI als Positivkontrolle (PK) mit pathologischen Seren. Die einzelnen Seren wurden in den Verdünnungen 1:2, 1:3, 1:4, 1:8 und 1:16 im Gefrierschnittmodell verwendet und die Verdünnungen mit der höchsten Spaltbildung (1:2, 1:3 und 1:4) ausgewählt. Es wurden 3 Versuchsreihen (n=3) durchgeführt. Dabei wurde der Prozentsatz der induzierten Spaltbildung entlang der DEJ mikroskopisch ausgewertet. Danach wurden die Prozentsätze der einzelnen Versuchsgruppen mit normalen Seren und der jeweiligen Versuchsgruppen mit pathologischen Seren mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests verglichen. Dabei ergab sich bei der Versuchsgruppe I eine mittlere DES \pm SEM von $0,0 \pm 0,11$, bei Versuchsgruppe II eine mittlere DES \pm SEM von $1,11 \pm 0,48$ und bei Versuchsgruppe III eine DES \pm SEM von $1,83 \pm 0,5$ (P: 0,059). Der Unterschied zwischen den Versuchsgruppen mit normalen Seren und den unterschiedlichen Konzentrationen von Vildagliptin (siehe Abb. 12) war nicht signifikant.

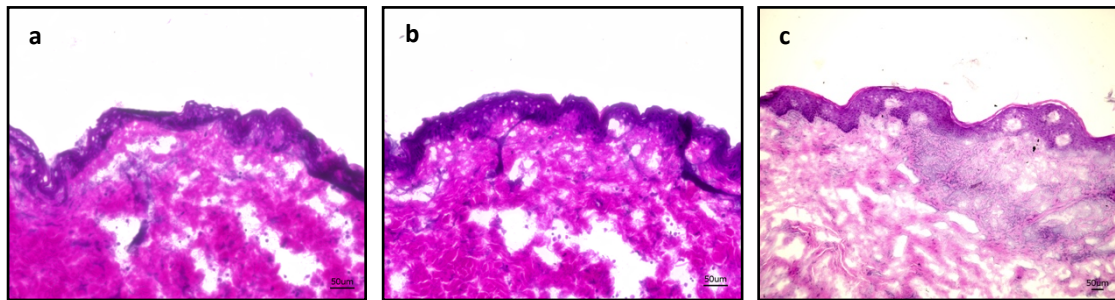


Abbildung 12: Bildung von ROS in Gefrierschnitten, die mit Seren gesunder Spender in der Verdünnung von 1:2 und Vildagliptin in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert wurden. Keine Spaltbildung konnte in der Negativkontrolle mit Seren ausgelöst werden (a), sowie in den Gefrierschnitten, die mit Vildagliptin in Konzentration von 1 µM (b) und 10 µM (c) inkubiert wurden. In der angewendeten H-E-Färbung stellt sich die Epidermis lila, die Dermis rosa dar. (Vergrößerung **a**, **b**: 20fach **c**: 10fach).

Für die Versuchsgruppen mit den pathologischen Seren ergab sich bei der Versuchsgruppe IV eine mittlere DES ± SEM von $9,32 \pm 4,8$, bei der Versuchsgruppe V eine DES ± SEM von $7,73 \pm 3,04$ und bei Versuchsgruppe VI von $12,2 \pm 5,95$. Dabei betrug P 0,837 und zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen an (siehe Abb. 13).

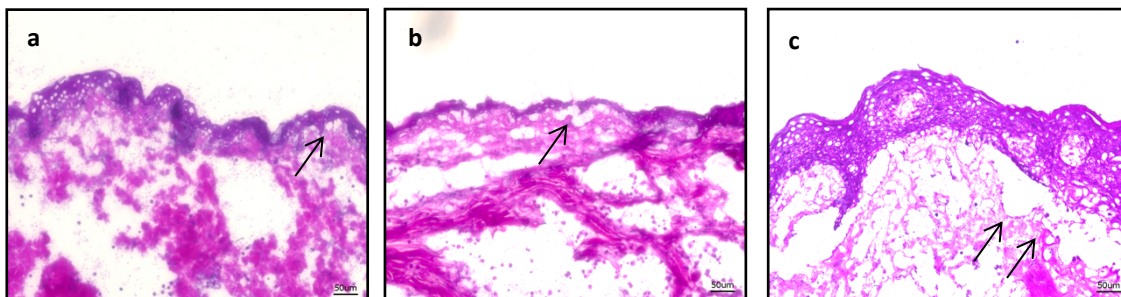


Abbildung 13: Bildung von ROS in Gefrierschnitten, die mit Seren von Spendern mit BP in der Verdünnung von 1:3 und Vildagliptin in den Konzentrationen 1 µM und 10 µM inkubiert wurden. Sowohl in der Positivkontrolle (a), als auch in den Gefrierschnitten mit Vildagliptin 1 µM (b) und 10 µM (c) konnte eine Spaltbildung ausgelöst werden. Der Pfeile markieren den dermo-epidermalen Spalt. (H-E-Färbung und Vergrößerung **a**, **b**, **c**: 20fach).

3.2. Effekte von DPP-IV Inhibitoren auf die Bildung von ROS im ROS-Release

Die Bildung von ROS kann mittels Chemilumineszenz im ROS-Release gemessen werden. Dazu wurde eine Mikrotiterplatte mit isolierten humanen neutrophilen Granulozyten inkubiert. Eine halbe Platte wurde vorher mit Immunkomplexen gecoatet während die andere Plattehälfte ohne Immunkomplexe als Kontrolle inkubiert worden ist.

Für ROS-Release wurde Vildagliptin in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM verwendet; es wurden 3 Versuchsreihen durchgeführt. Um die Ergebnisse von DPP-IV Inhibitoren zu stärken, wurde auch Sitagliptin als ein alternativer Wirkstoff von der gleichen Familie der DPP-IV Inhibitoren untersucht. Sitagliptin wurde in den gleichen Konzentrationen wie Vildagliptin (1 μM und 10 μM) verwendet und es wurden 3 Versuchsreihen durchgeführt. Zum Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

Die Ergebnisse für Vildagliptin zeigten bei diesem Test einen signifikanten Unterschied zwischen den Signalen der einzelnen Gruppen ($P < 0,001$). Mithilfe von Dunn's Methode konnten die verschiedenen Gruppen verglichen werden. Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied ($P < 0,001$) zwischen den Gruppen, die ohne Immunkomplexe inkubiert wurden und den jeweiligen Gruppen, die mit Immunkomplexen und Vildagliptin in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM inkubiert wurden. Zwischen den Gruppen, die mit Immunkomplexen inkubiert wurden, zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und der mit Vildagliptin in der Konzentration 1 μM behandelten Gruppe. Im Vergleich dazu zeigte sich zwischen Kontrollgruppe und mit Vildagliptin 10 μM behandelten Gruppe ein signifikanter Unterschied ($P: 0,006$) (siehe Abb. 14).

Damit konnte im ROS-Release gezeigt werden, dass Vildagliptin in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM die durch Immunkomplexe induzierte Bildung von ROS in neutrophilen Granulozyten hemmt und die Hemmung von ROS hängt von der Konzentration von Vildagliptin ab.

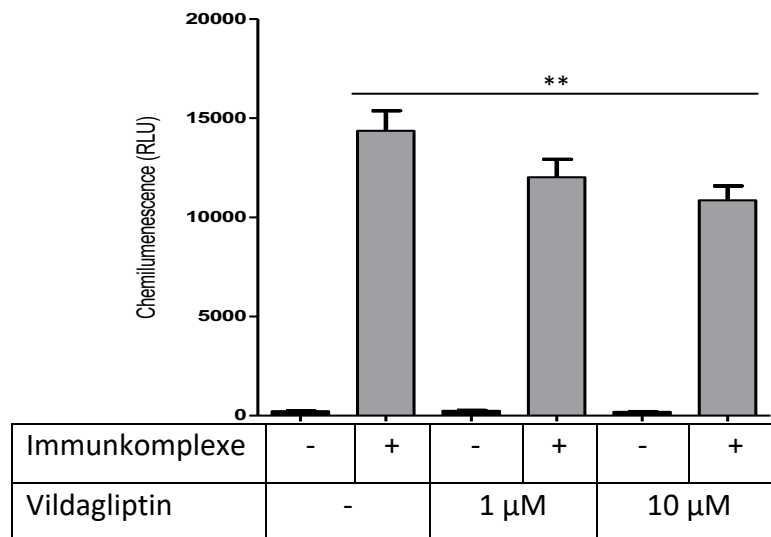


Abbildung 14: Die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist abhängig von der Vildagliptin-Dosis. Dargestellt ist die relative Freisetzung von ROS ohne und mit Immunkomplexen, sowie ohne und mit Vildagliptin in verschiedener Dosierung. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Sterne kennzeichnen die Werte, die einen signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) haben.

Die Ergebnisse für Sitagliptin zeigten im Kruskal-Wallis-Test auch einen signifikanten Unterschied zwischen den Signalen der einzelnen Gruppen ($P < 0,001$). Mithilfe von Dunn's Methode konnten die verschiedenen Gruppen verglichen werden. Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied ($P < 0,001$) zwischen den Gruppen, die ohne Immunkomplexe inkubiert wurden und den jeweiligen Gruppen, die mit Immunkomplexen und Sitagliptin in den Konzentrationen 1 µM und 10 µM inkubiert wurden. Zwischen den Gruppen, die mit Immunkomplexen inkubiert wurden, zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und mit Sitagliptin in Konzentration 1 µM-behandelter Gruppe ($P < 0,001$), sowie zwischen Kontrollgruppe und mit Sitagliptin 10 µM-behandelter Gruppe ($P < 0,001$) (siehe Abb. 15).

Damit konnte im ROS-Release gezeigt werden, dass sowohl Vildagliptin als auch Sitagliptin in den Konzentrationen 1 µM und 10 µM die durch Immunkomplexe induzierte Bildung von ROS in neutrophilen Granulozyten hemmen und die Hemmung von ROS von der Konzentration des Wirkstoffes abhängt.

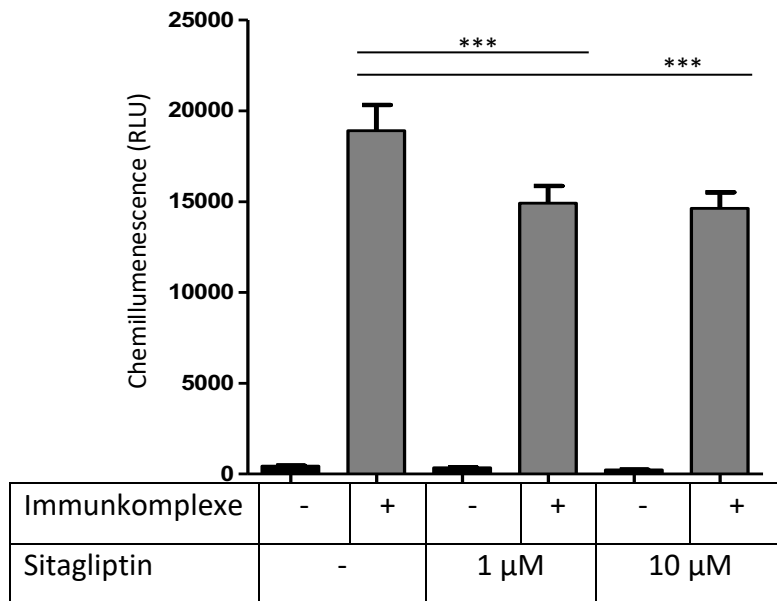


Abbildung 15: Die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist abhängig von der Sitagliptin-Dosis. Gezeigt ist die relative Freisetzung von ROS ohne und mit Immunkomplexen, sowie ohne und mit Sitagliptin in verschiedener Dosierung. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD). Die Sterne kennzeichnen die Mittelwerte, die sich signifikant unterscheiden ($P < 0,05$).

3.3. Wirkung der DPP-IV Inhibitoren auf das Überleben der Zellen

Die Lebensfähigkeit von Zellen wurde mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Für die Durchflusszytometrie wurden PMNs verwendet, die mit Immunkomplexen und Vildagliptin in Konzentrationen 1 μM und 10 μM und ohne Immunkomplexe als Kontrolle für 3 Stunden und 24 Stunden stimuliert wurden. 3 Versuchsreihen wurden durchgeführt und zum Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Die Ergebnisse nach 3 Stunden PMNs-Stimulation zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Signalen der einzelnen Gruppen (P : 0.983); auch nach 24 Stunden PMNs-Stimulation zeigten die Ergebnisse keinen signifikanten Unterschied zwischen den Signalen der einzelnen Gruppen (P : 0.805). Dabei ergab sich, dass Vildagliptin in den verwendeten Konzentrationen keinen schädlichen Effekt für die Zellen auslöst und auch die nachfolgenden Ergebnisse von ELISA und Echtzeit-PCR nicht aus einem erhöhten Zelltod in der jeweiligen Probe hervorgegangen sind (siehe Abb. 16).

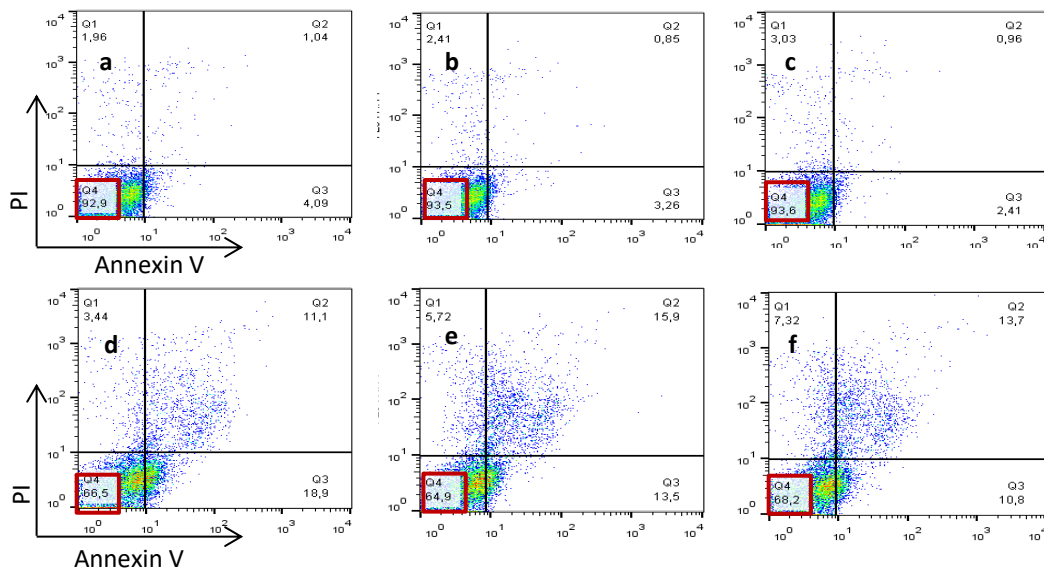


Abbildung 16: Vildagliptin in Konzentrationen 1 μM und 10 μM ist nicht schädlich für PMNs. Die Zahl der Zellen nach 3 Stunden Stimulation in der Kontrollgruppe (a) ist fast gleich mit der Zahl der Zellen nach 3 Stunden Stimulation mit Vildagliptin 1 μM (b) und Vildagliptin 10 μM (c). Anschließend konnte die gleiche Zahl von Zellen nach 24 Stunden Stimulation zwischen der Kontrollgruppe (d) und den Gruppen mit Vildagliptin 1 μM und 10 μM (e, f) festgestellt werden.

3.4. Effekte von DPP-IV Inhibitoren zur IL8 Freigabe von PMNS durch ELISA

Die Freigabe von IL8 kann mittels PMNs Stimulation und anschließend ELISA gemessen werden. Dazu wurde eine Mikrotiterplatte mit Immunkomplexen und isolierten humanen PMNs inkubiert; der Überstand von den Zellen wurde nach 3 Stunden und 24 Stunden Stimulation gesammelt und für ELISA verwendet. Für ELISA IL8 wurde Vildagliptin in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM verwendet und es wurden 3 Versuchsreihen durchgeführt. Zum Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Die Ergebnisse für Vildagliptin nach 3 Stunden Stimulation zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den Signalen der einzelnen Gruppen ($P < 0,001$). Mithilfe von Dunn's Methode konnten die verschiedenen Gruppen verglichen werden. Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der jeweiligen Gruppe, die mit Immunkomplexen inkubiert wurde, und der jeweiligen Gruppe ohne Immunkomplexe. Jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Vildagliptin 1 μM und 10 μM , wenn diese Gruppen mit Immunkomplexen inkubiert wurden.

Die Ergebnisse für Vildagliptin nach 24 Stunden Stimulation zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den Signalen der einzelnen Gruppen ($P < 0,001$). Die verschiedenen Gruppen konnten auch verglichen werden; es ergab sich ein signifikanter Unterschied ($P < 0,001$) zwischen allen Gruppen. Hier ergab sich auch ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, die mit Immunkomplexen inkubiert wurden. Dabei zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und mit Vildagliptin in Konzentration 1 μM -behandelter Gruppe ($P: 0,026$), sowie zwischen Kontrollgruppe und mit Vildagliptin 10 μM -behandelter Gruppe ($P: 0,001$) (siehe Abb. 17).

Damit konnte mit ELISA IL8 gezeigt werden, dass Vildagliptin in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM die Freigabe von IL8 stimuliert, für 24 Stunden PMNs hemmt und diese Hemmung von der Vildagliptinkonzentration abhängt.

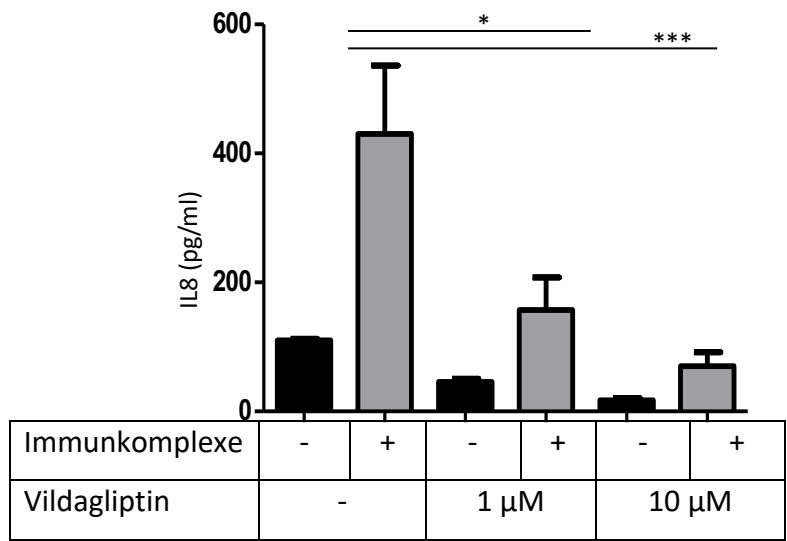


Abbildung 17: Freigabe von IL8 nach 24 PMNs Stimulation und gleichzeitiger Behandlung mit Vildagliptin. Freigabe von IL8 ist abhängig von der Vildagliptin-Dosis. Gezeigt ist die relative Freigabe von IL8 ohne und mit Immunkomplexen, sowie ohne und mit Vildagliptin in verschiedener Dosierung. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Sterne kennzeichnen statistisch signifikanten der Mittelwerte ($P < 0,05$).

3.5. Effekte von DPP-IV Inhibitoren zur IL6 Freigabe von PMNs durch ELISA

Die Freigabe von IL6 wurde auch mittels PMNs Stimulation und anschließender ELISA gemessen. Die PMNs wurden auch nach 3 Stunden und 24 Stunden mit Immunkomplexen und Vildagliptin (in den Konzentrationen: 1 μ M und 10 μ M) stimuliert; der Überstand wurde danach gesammelt und für ELISA verwendet. Für ELISA IL6 wurden 3 Versuchsreihen durchgeführt. Zum Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

Die Ergebnisse für Vildagliptin nach 3 Stunden Stimulation zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den Signalen der einzelnen Gruppen ($P < 0,001$). Die verschiedenen Gruppen wurden auch verglichen. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der jeweiligen Gruppe, die mit Immunkomplexen inkubiert wurde, und der jeweiligen Gruppe ohne Immunkomplexe.

Die Ergebnisse für Vildagliptin nach 24 Stunden Stimulation zeigten ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den Signalen der einzelnen Gruppen ($P < 0,001$). Bei den verschiedenen Gruppen ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe von Zellen ohne Immunkomplexe und der Kontrollgruppe mit Vildagliptin in Konzentration 1 μ M ohne Immunkomplexe ($P: 0,003$), ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe mit Immunkomplexen und Vildagliptin in Konzentration 1 μ M und ohne Immunkomplexe Gruppe ($P < 0,001$) und ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und mit Vildagliptin 10 μ M-behandelter Gruppe (beide wurden mit Immunkomplexen stimuliert) ($P: 0,01$) (siehe Abb. 18).

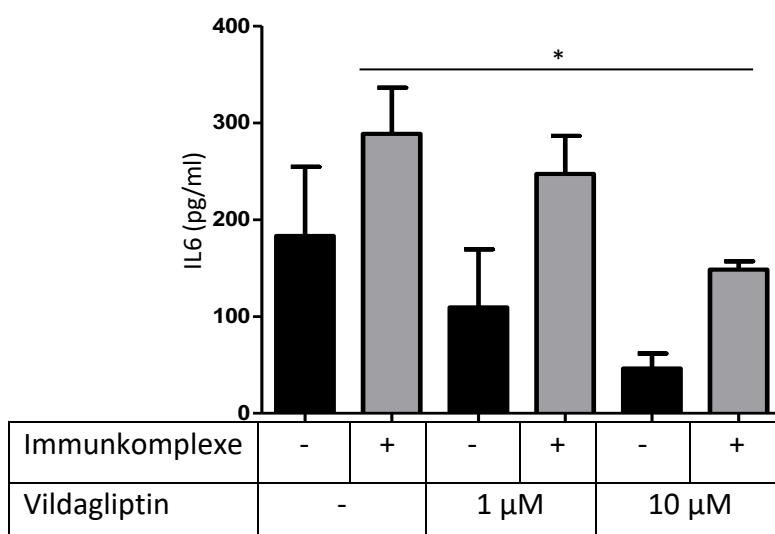


Abbildung 18: Freigabe von IL6 durch PMNs Stimulation mit Immunkomplexen und Vildagliptin nach 24 Stunden. Freigabe von IL6 ist abhängig von der Vildagliptin-Dosierung. Gezeigt ist die relative Freigabe von IL6 ohne und mit Immunkomplexen, sowie ohne und mit Vildagliptin in verschiedener Dosis. Die Daten sind wiederum dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Sterne kennzeichnen die Mittelwerte, die einen signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) haben.

3.6. Effekte von DPP-IV Inhibitoren zur IL8 Freisetzung mittels quantitative PCR

Die Quantifizierung von IL8 aus PMNs wurde mithilfe der quantitativen Echtzeit-PCR untersucht. PMNs wurden vorher mit Vildagliptin und Immunkomplexen für 3 Stunden und 24 Stunden stimuliert; die Zellen wurden danach für Echtzeit-PCR mit Trizol reagent extrahiert und bei -80° C gelagert. Nach c-DNA Synthese und PCR-Amplifikation von c-DNA wurden die Daten als Delta-Ct-Werte der IL8-Gene in Bezug auf GAPDH vorgestellt. Die Genexpression wurde in jeder gepaarten Probe wie folgt berechnet: Genexpression ΔCt (Ct-GAPDH – Ct-IL8) = Durchschnitt von GAPDH-Expression (Ct-GAPDH) minus Durchschnitt IL8-Expression (Ct-IL8). Die Werte wurden als $2^{\Delta Ct}$ vorgestellt und der Kruskal-Wallis-Test zum Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen herangezogen.

Nach 3 Stunden Stimulation zeigten die Daten einen signifikanten Unterschied zwischen den Signalen der einzelnen Gruppen (P: 0,046). Die verschiedenen Gruppen wurden auch verglichen, es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der jeweiligen Gruppe, die mit Immunkomplexen inkubiert wurde, und der jeweiligen Gruppe ohne Immunkomplexe. Trotzdem zeigen die Ergebnisse, dass bei Vildagliptin-behandelten Gruppen reduzierte Produktion von IL8 beobachtet wurde (siehe Abb. 19). Die Daten nach 24 Stimulation zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Signalen den Gruppen (P: 0,927).

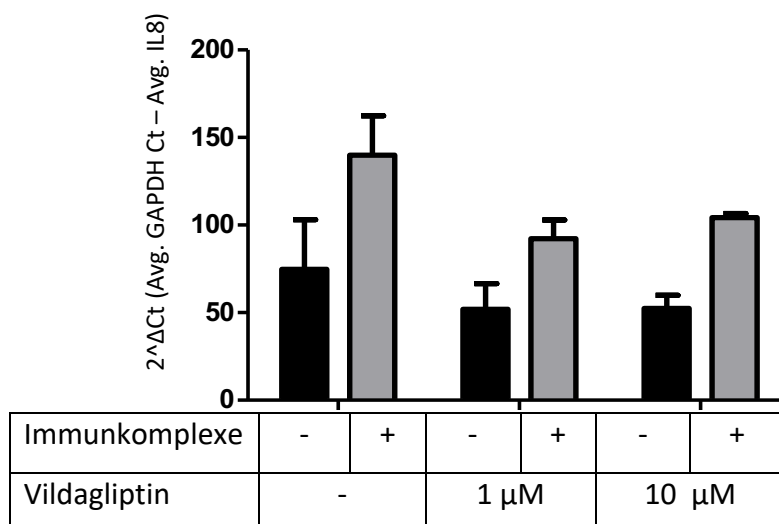


Abbildung 19: Freisetzung von IL8 mittels quantitativer Echtzeit-PCR nach 3 Stunden Stimulation mit Immunkomplexen und Vildagliptin (1 μM und 10 μM). Bei Vildagliptin-behandelten Gruppen wurde reduzierte Produktion von IL8 beobachtet. Die Daten zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen

den Signalen der einzelnen Gruppen (P: 0,046). Die Daten sind auch als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

3.7. Effekte von DPP-IV Inhibitoren bei EBA Mausversuch

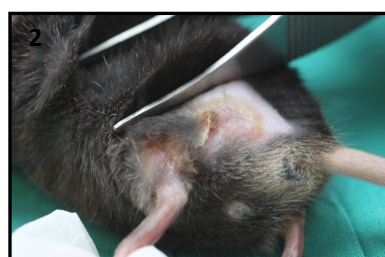
Die passiven Mausmodelle von EBA wurden zweimal durchgeführt. Jedes Experiment enthielt zwei Gruppen; eine Kontrollgruppe und eine mit Vildagliptin-behandelte Gruppe. Davon bestand jede Gruppe aus 5 Mäusen. Der jeweilige Mausversuch wurde insgesamt 15 Tage durchgeführt und die klinische Bewertung der Erkrankungsschwere wurde an den Tagen 0, 5, 7, 10 und 13 durchgeführt (siehe Abb. 16). Die von den Mäusen entnommenen Biopsien wurden für Histologie und direkte Immunfluoreszenz verwendet.

Zum Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen wurde der two-way ANOVA Test durchgeführt, um sowohl die zwei unterschiedlichen Gruppen als auch die klinische Bewertung jedes einzelnen Bewertungstags vergleichen zu können.

Die statistische Analyse der beiden Gruppen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der mit Vildagliptin-behandelten Gruppe, basierend auf dem Prozentsatz der betroffenen Körperoberfläche der Mäuse ($P: 0,357$). Trotzdem zeigt der Prozentsatz der betroffenen Körperoberfläche der Mäuse einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Tagen der Auswertung ($P < 0,001$) (siehe Abb. 20).



Maus von Kontrollgruppe



Maus der mit Vildagliptin-behandelten Gruppe

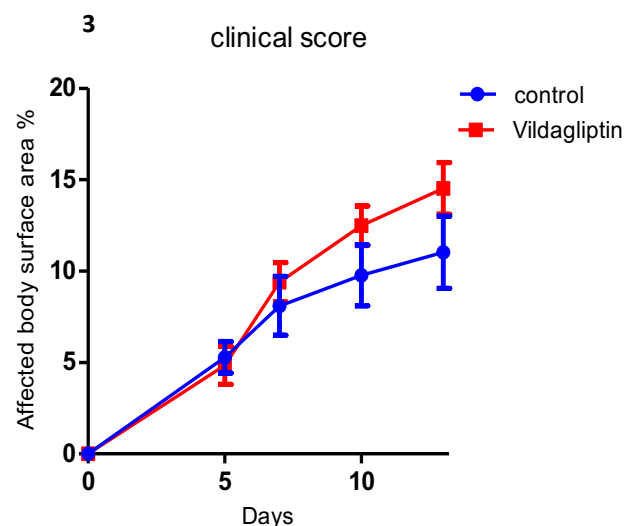


Abbildung 20: Klinische Bewertung der betroffenen Körperoberfläche. Sie zeigt den klinischen Phänotypus von Kontrollmaus (1) und mit Vildagliptin-behandelter Maus (2) sowie die klinische

Bewertung der EBA an den Tagen: 0, 5, 7, 10 und 13 (3). Die Daten zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($P: 0,357$) und einen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Tagen von Auswertung ($P < 0,001$). Trotzdem weisen die Mäuse, die Vildagliptin eingenommen haben, die größte Rate der betroffenen Körperoberfläche auf.

Es wurde auch Histologie und direkte Immunfluoreszenz für IgG-Ablagerung und die Ablagerung von Komplement C3 durchgeführt. Die Proben wurden von den Ohren der Mäuse nach Ende des Versuches entnommen. Danach wurde die jeweilige Färbung für jede Probe durchgeführt und die eingedeckten Schnitte wurden unter dem Mikroskop in 10facher und 20facher Vergrößerung ausgewertet und fotografiert. (siehe Abb. 20).

Die histopathologischen Befunde zeigen eine subepidermale Blasenbildung, sowie eine eosinophile und neutrophile Infiltration. Trotzdem ergab sich nach Auswertung unter dem Mikroskop kein signifikanter Unterschied zwischen den Mäusen, die mit Vildagliptin behandelt wurden, und den Mäusen der Kontrollgruppe (siehe Abb. 17).

Die Befunde der direkten Immunfluoreszenz zeigen eine lineare Ablagerung von IgG und C3 entlang der DEJ. Die Ablagerungen von Antikörpern und Komplement sind nicht immer linear und können unterschiedliche Muster wie n- oder u-Zacken Muster an der Basalmembranzzone aufweisen. Nach der Auswertung der Schnitte unter dem Mikroskop zeigen die Ergebnisse von direkter Immunfluoreszenz sowohl für IgG-Ablagerung, als auch für C3 Ablagerung keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollmäusen und den mit Vildagliptin-behandelten Mäusen (siehe Abb. 21).

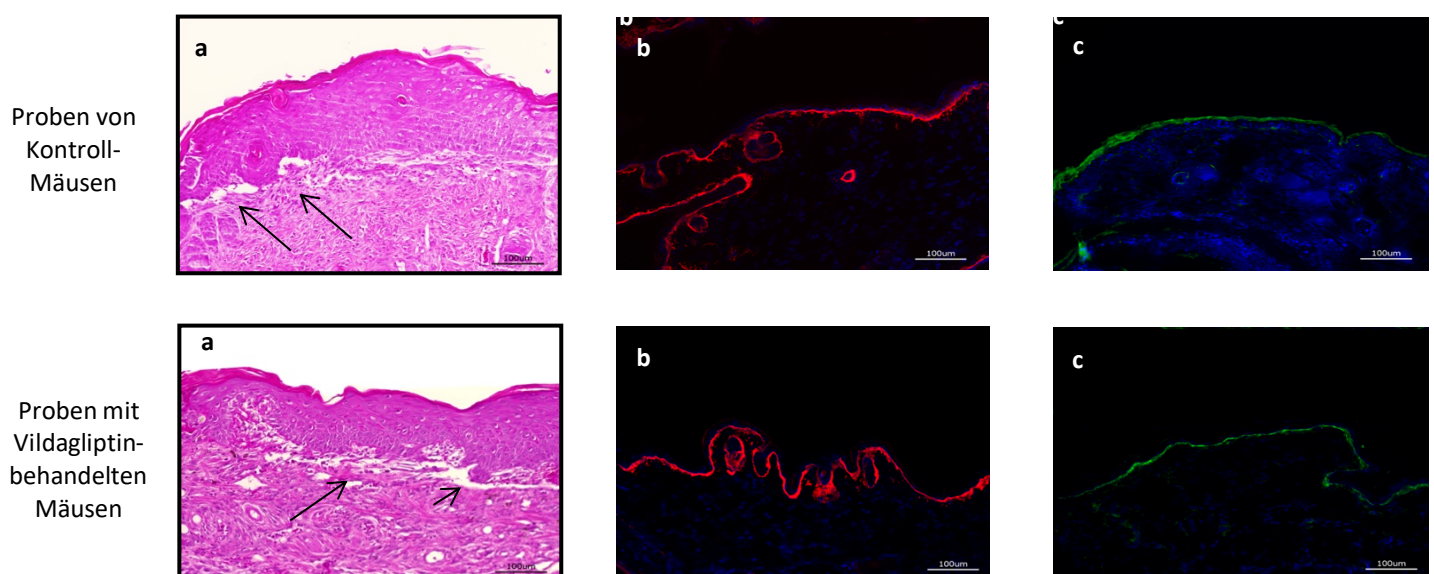


Abbildung 21: Befunde von Histopathologie und direkter Immunfluoreszenz für Ablagerung von IgG und C3. Die histopathologischen Befunde (H-E-Färbung) zeigen eine subepidermale Blasenbildung, sowie das Vorkommen eosinophiler und neutrophiler Infiltrate (a). Die Befunde von direkter Immunfluoreszenz für IgG-Ablagerung zeigen die Ablagerung von Antikörpern an der Basalmembranzzone (b) und die Befunde von direkter Immunfluoreszenz für C3 zeigen eine lineare Ablagerung von C3 an der Basalmembranzzone (c). Es ergab sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen von Mäusen. Die Pfeile markieren den dermo-epidermalen Spalt. (Vergrößerung **a, b, c:** 10fach).

4. Diskussion

Dipeptidylpeptidase-IV Inhibitoren stellen eine Wirkstoffklasse unter den Antidiabetika dar, die für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt werden. Die Substanzen der DPP-IV Inhibitoren wirken durch das Enzym Dipeptidylpeptidase-IV, welches den Abbau des Hormons Glucagon-like Peptid hemmt. DPP-IV wird in Epithelzellen, Kapillarendothelzellen und Lymphozyten exprimiert. Dieses Protein ist auch mit vielen physiologischen Funktionen assoziiert, welche die enzymatische Aktivität der Inkretin-Degradierung und des Immunsystems beinhalten. Es spielt auch eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion und Hemmung von Krebswachstum (Filippatos et al. 2014). Die Expression des DPP-IV Proteins ist bei verschiedenen Hauterkrankungen erhöht, einschließlich T-Zell-Lymphomen, Psoriasis, Lichen planus und atopischer Dermatitis (Tasanen et al. 2019).

Eine Reihe von publizierten Fallberichten und Registerstudien zeigen, dass DPP-IV Inhibitoren ein bullöses Pemphigoid auslösen können. Die Patienten dieser Fallberichte zeigten keinerlei Autoimmun-, neoplastische- oder Infektions-Vorerkrankungen; die Latenzzeit zwischen der Therapie mit Gliptinen und der BP-Diagnose lag zwischen 1 und 53 Monaten. Bemerkenswert ist, dass eine komplette Remission in den meisten Patienten nach dem Absetzen der DPP-IV Inhibitoren beobachtet wurde.

Die bullösen Pemphigoide gehören zu der Familie der blasenbildenden Autoimmunerkrankungen. Ausschlaggebend für die Entstehung dieser Erkrankungen sind Autoantikörper gegen Proteine der Hemidesmosomen. Nach der Bindung der Autoantikörper an dem jeweiligen Strukturprotein kommt es zur Zusammensetzung von Immunkomplexen, was zu einem proinflammatorischen Zustand in der Haut führt. Anschließend kommt es zur Rekrutierung und Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und zur Sekretion von proteolytischen Enzymen und ROS. Diese Sequenz ist für die Schädigung der DEJ verantwortlich, und histologisch ist eine subepidermale Spaltbildung sichtbar (Chiriac et al. 2007).

In dieser Arbeit untersuchten wir die Wirkung des DPP-IV Hemmers Vildagliptin, auf die Effektorphase der Pemphigoid-Erkrankungen mittels eines Mausmodells und mittels einer Serie von In-vitro-Versuchen mit humanen Neutrophilen, einer der zentralen Effektorzellen in der Pathogenese der Pemphigoid-Erkrankungen. Als alternativer Wirkstoff der DPP-IV Inhibitoren bei ROS Release wurde auch Sitagliptin untersucht.

4.1. Das Gefrierschnittmodell

Die Ergebnisse der Gefrierschnittmodelle ergeben keine signifikant erhöhte Spaltbildung sowohl zwischen den Proben der Positivkontrolle (P: 0,837), als auch zwischen der Negativkontrolle (P: 0,059). Zurückkommend auf die Art und Weise, mit denen das Gefrierschnittmodell durchgeführt wird, können wir feststellen, dass eine entscheidende Rolle für die Spaltbildung zwischen Epidermis und Dermis, außer den Antikörpern von BP-Patienten (BP 180 und BP230), auch die neutrophilen Granulozyten und der Einfluss der Hemmung von DPP-IV-Enzym auf diese Zelle spielen. Die Inkubation der Gefrierschnitte mit Neutrophilen führt zur Spaltbildung zwischen Epidermis und Dermis durch die Verbindung mit der NC16A-Domäne von BP 180 (Sitaru et al. 2002).

Herlihy et al. haben die Wirkung des DPP-IV-Enzyms auf die Neutrophilen erforscht. Das Enzym DPP-IV hat die Fähigkeit, die Akkumulation von humanen Neutrophilen zu vermindern. Aber die Inhibitoren, die die Wirkung von DPP-IV blockieren, rufen keine Verringerung der Rekrutierung von Neutrophilen hervor (Herlihy et al. 2013). Im Detail haben Herlihy et al. die Wirkung von den Enzymen Diprotin A und DPPI 1c-Hydrochloride auf die Neutrophilen erforscht, die die Funktion des DPP-IV hemmen (Herlihy et al. 2013, Wright et al. 2006, Rahfeld et al. 1991). Ihre Ergebnisse zeigten, dass die Hemmer des DPP-IV keine Abstoßung, aber auch keine Attraktion von menschlichen Neutrophilen auslösen konnten. Als einer der Inhibitoren mit DPP-IV hinzugefügt wurde, war das Zurückstoßen von Neutrophilen im Vergleich zu dem DPP-IV-Enzym allein deutlich reduziert (Herlihy et al. 2013). Dies deutet darauf hin, dass die DPP-IV Inhibitoren die Fähigkeit von DPP-IV blockieren, um die Abstoßung von Neutrophilen zu induzieren. Jedoch hat die Kristall Struktur des menschlichen DPP-IV in einem Komplex mit Diprotin A keinen signifikanten Strukturunterschied im Vergleich zu dem DPP-IV allein (Herlihy et al. 2013, Hiramatsu et al. 2004). Dies deutet darauf hin, dass die Inhibitoren die Repulsion von Neutrophilen auf andere Weise anregen, als die Hemmung der Fähigkeit, etwas in dem Testmedium zu spalten (Herlihy et al. 2013). Während des Versuches wurden die Neutrophilen in RPMI 1640 aufgestellt, was Rinderalbumin (Albumin Fraktion V oder BSA) oder Humanalbumin auf einer Fibronectin Oberfläche enthielt. Die einzige bekannte enzymatische Aktivität von DPP-IV besteht in der Spaltung von zwei Aminosäuren von dem N-Terminus eines Proteins, wenn sich in der zweiten Position Prolin oder Alanin befindet (Herlihy et al. 2013, Chen et al. 2003). Aber RPMI 1640 enthält keine Proteine, und

BSA als auch menschliches Albumin besitzen kein Prolin oder Alanin als zweite Aminosäure. Zusätzlich konnte DPP-IV nach 3 Stunden Inkubation nicht BSA oder Humanalbumin spalten, aber auch konditionierte Medien aus Neutrophilen wurden mit Puffer allein inkubiert und konnten keine Anziehung oder Abstoßung von Neutrophilen verursachen. Außerdem ist eine Kontamination von der Präparation der Neutrophilen nicht für die Abstoßung von Neutrophilen verantwortlich (Herlihy et al. 2013). Konditionierte Medien, die mit DPP-IV und Neutrophilen inkubiert wurden, verursachen eine Abstoßung der Neutrophilen. Nach der gleichzeitigen Inkubation dieser Lösung mit einem DPP-IV Hemmer wird diese Funktion blockiert. Das deutet daraufhin, dass die abstoßende Aktivität der Neutrophilen in den konditionierten Medien, insbesondere auf die Anwesenheit der DPP-IV-Aktivität beruht (Herlihy et al. 2013).

Nach Herlihy et al. wurden auch DPP-IV-Knockout-Mäuse generiert. Herlihy et al. 2013, Marguet et al. 2000). Diese Versuchstiere hatten normale Blutspiegel der meisten Leukozyten, einschließlich Neutrophilen, obwohl die arthritischen Gelenke abnormal hohe Konzentrationen von Neutrophilen enthielten (Herlihy et al. 2013, Christopherson et al. 2003, Kidd et al. 2011, Wright et al. 2010). DPP-IV-Knockout-Mäuse zeigten eine erhöhte Ausprägung in der experimentell induzierten Arthritis mit einem zweifachen Anstieg in der Anzahl der Zellen innerhalb der Gelenke (Herlihy et al. 2013, Busso et al. 2005). In einer nachfolgend publizierten Studie haben sich Herlihy et al. auf die Rolle des löslichen DPP-IV-Enzyms fokussiert, um in einem Mausmodell die Arthritis-Entzündung zu reduzieren (Herlihy et al. 2015). DBA/1-Mäuse wurden mit Typ II Kollagen immunisiert und haben infolgedessen eine Kollagen-induzierte Arthritis entwickelt. Am Tag 25 nach der Immunisierung wurde rekombinantes humanes DPP-IV (rhDPP-IV) oder PBS intraartikulär injiziert und die Arthritis-Ausprägung 3-mal pro Woche evaluiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Injektion von rhDPP-IV den mittleren Score der Schwere der Arthritis bei Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis reduziert. DPP-IV Behandlung kann sowohl das gesamte Ausmaß der Entzündung als auch die Schäden rund um die Gelenke und das periartikuläre Gewebe reduzieren und auch die Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen verringern. Auf der anderen Seite wurden erniedrigte Spiegel von DPP-IV in der synovialen Flüssigkeit und synovialen Membran von Patienten mit rheumatoider Arthritis beobachtet; deswegen korreliert die geringere Menge von DPP-IV mit einer erhöhten Inzidenz und Schwere der Arthritis (Herlihy et al. 2015, Busso et al. 2005, Kamori et al. 1991, Gotoh et al. 1989). Geringe Menge von DPP-IV korrelieren auch

mit erhöhter Entzündung in den Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Kamori et al. 1991). Die erhöhte Entzündung, die bei den DPP-IV-defizienten Situationen beobachtet wurde, konnte aber nicht der direkten Wirkung der DPP-IV Inhibitoren auf die Neutrophilen zugeschrieben werden. Ursächlich für diese Inflammation könnte die Präsenz von Chemokinen sein. (Herlihy et al. 2013, Yazbeck et al. 2009).

Die Ergebnisse von Herlihy et al. sind mit unseren Ergebnissen vom Gefrierschnittmodell vergleichbar. Wir haben ebenfalls die Neutrophilen mit Vildagliptin inkubiert und konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen beobachten. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Inhibitoren des DPP-IV keine Abstoßung oder Attraktion von menschlichen Neutrophilen verursachen können, trotz der Fähigkeit des DPP-IV-Enzyms, die Akkumulation von humanen Neutrophilen zu vermindern. Obwohl eine erhöhte Entzündungsreaktion bei Patienten mit rheumatoider Arthritis beobachtet wurde, bei denen der Prozentsatz des intraartikulären DPP-IV verringert war, wird dennoch diese Situation möglicherweise der Wirkung von verschiedenen Chemokinen zugeschrieben. Diese Chemokine könnten auch zu erhöhter Spaltbildung führen. Auf der anderen Seite setzen neutrophile ROS verschiedene proteolytische Enzyme wie Kollagenase, Elastase und Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP 9) frei, die unentbehrlich für die Spaltbildung sind. Es gibt einige publizierte Studien, die sich auf den Einfluss der DPP-IV Inhibitoren auf die MMP 9 beziehen. Gemäß diesen Studien können die DPP-IV Inhibitoren die Produktion von MMP 9 reduzieren, jedoch ist die Pathogenese dieser Situation noch unbekannt (Moraes et al. 2015, Lu et al. 2016, Lu et al. 2015). Eine Reduktion der Produktion von MMP 9 in der Kombination mit der geringeren Freisetzung der ROS von unseren Versuchen könnte zur Reduktion der Spaltbildung führen. Da die Ergebnisse statistisch nicht signifikant sind, können wir keine definitive Aussage machen.

4.2. Effekte von DPP-IV Inhibitoren auf das Überleben der Zellen

Die Ergebnisse nach 3 Stunden PMNs-Stimulation zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Signalen der einzelnen Gruppen (ohne Vildagliptin und mit Vildagliptin in Konzentrationen von 1 μM und 10 μM) (P: 0.983); ebenso zeigten die Ergebnisse nach 24 Stunden PMNs-Stimulation auch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Signalen der Positiv- und der Negativkontrolle (P: 0.805). Da die Zahl der Zellen zwischen den Gruppen ohne Vildagliptin und mit Vildagliptin in 1 μM und 10 μM keinen signifikanten Unterschied gezeigt hat, ergab sich, dass die DPP-IV Inhibitoren in den verwendeten Konzentrationen keinen schädlichen Effekt für die Zellen aufweisen. Reinhold et al. haben die Effekte von DPP-IV Inhibitoren auf das Überleben der PBMC getestet (Reinhold et al. 1997). PBMC wurden von Blut gesunder Spender gewonnen und mit Heparin antikoaguliert. Die Zellen (10^5 Zellen / 100 μl) wurden bei CG Medium mit PWM (2 μg / ml) und bei verschiedenen Konzentrationen (0 μM , 2 μM , 4 μM , 6 μM und 10 μM) der synthetischen reversiblen Inhibitoren der DPP-IV (Lys[Z(NO₂)] -thiazolidide, Lys[Z(NO₂)] -piperidide, und Lys[Z(NO₂)] -pyrrolidide) simuliert. Anschließend wurde das Überleben der Zellen mithilfe des MTT Testes ausgewertet. 5 mg von dem Tetrazoliumsalz MTT wurde im 1 ml CG Medium gelöst. 25 ml von dieser Stammlösung wurden mit 100 μl von der Zellkultur vermischt und die Platte wurde bei 37° C für 4 Stunden inkubiert. Danach wurde die Platte bei 600 g für 10 Minuten zentrifugiert, das Medium wurde verworfen und jedes Well wurde mit 100 μl angesäuert Isopropylalkohol / Dimethylformamid-Lösung ausgefüllt. Anschließend wurde die Konzentration des Formazan mithilfe des ELISA gemessen. Die Ergebnisse zeigten keine Schwächung des MTT, verursacht von der Wirkung der DPP-IV Inhibitoren. Das deutet darauf hin, dass die DPP-IV Inhibitoren in Konzentrationen von 1 μM bis 10 μM keine schädliche Wirkung auf die Zellen hervorrufen (Reinhold et al. 1997).

4.3. Effekte von DPP-IV Inhibitoren auf die Bildung von ROS, ELISA und mittels quantitative PCR

Die Testung der DPP-IV Inhibitoren mithilfe des ROS Release erfolgte mit zwei verschiedenen DPP-IV Inhibitoren. Die DPP-IV Inhibitoren, die verwendet wurden, waren Vildagliptin und Sitagliptin. Sitagliptin wurde als ein alternatives Medikament von der Familie der DPP-IV Inhibitoren ausgewählt, um die Ergebnisse der DPP-IV Inhibitoren auf ROS zu verstärken. Bei beiden Wirkstoffen zeigten sich eine signifikante absteigende Freisetzung von ROS Release, die abhängig von der Konzentration der Inhibitoren war. Die Werte des ROS unterschieden sich zwischen Vildagliptin und Sitagliptin. Dies könnte entweder auf den metabolischen Zustand der neutrophilen Granulozyten und folglich der Sekretion von ROS, oder auf die Wirkung von DPP-IV Inhibitoren bei den neutrophilen Granulozyten zurückgeführt werden, da die beiden Inhibitoren eine unterschiedliche Halbwertszeit haben (Die Halbwertszeit von Sitagliptin beträgt 8 bis 14 Stunden, während von Vildagliptin zwischen 1,5 bis 4,5 Stunden liegt) (Filippatos et al. 2014).

Die Ergebnisse von ELISA nach 3 Stunden Stimulation zeigten eine hemmende Wirkung in der Freisetzung von IL8 in den Proben, die mit Vildagliptin inkubiert wurden und diese Wirkung war von der Konzentration des Vildagliptins abhängig. Zwischen den Signalen der einzelnen Gruppe ergab sich ein signifikanter Unterschied ($P < 0,001$); kein signifikanter Unterschied bestand zwischen der jeweiligen Gruppe, die mit Immunkomplexen inkubiert wurde, und der jeweiligen Gruppe ohne Immunkomplexe. Die Ergebnisse nach 24 Stunden Stimulation zeigten jedoch einen signifikanten Unterschied ($P < 0,001$) zwischen den Signalen der einzelnen Gruppen. Außerdem zeigten sie einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollgruppe und der Gruppe, die mit Vildagliptin in Konzentration $1 \mu\text{M}$ behandelt wurde ($P: 0,026$) sowie zwischen Kontrollgruppe und der Gruppe mit Vildagliptin $10 \mu\text{M}$ ($P: 0,001$).

Die Daten von IL8 mittels quantitativer PCR nach 3 Stunden Stimulation zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den Signalen der einzelnen Gruppen ($P: 0,046$). Zwischen der jeweiligen Gruppe, die mit Immunkomplexen inkubiert wurde und der jeweiligen Gruppe ohne Immunkomplexe, ergab sich hingegen kein signifikanter Unterschied. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass Vildagliptin eine hemmende Wirkung auf die IL8-Expression von PMNs verursachen konnte, die von der Dosierung des Vildagliptins abhängig war. Die Ergebnisse nach 24 Stunden Stimulation zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Signalen der Gruppen ($P: 0,927$), jedoch zeigte die mit Vildagliptin-behandelte Gruppen

auch eine geringere Expression von IL8. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der ELISA für IL8 überein und zeigen eine Hemmung in der Expression von IL8, abhängig von der Dosierung des Vildagliptins.

Die Ergebnisse von ELISA IL6 nach 3 Stunden Stimulation zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den Signalen der einzelnen Gruppen ($P < 0,001$). Die verschiedenen Gruppen wurden auch verglichen. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der jeweiligen Gruppe, die mit Immunkomplexen inkubiert wurde, und der jeweiligen Gruppe ohne Immunkomplexe. Trotzdem ist die Tendenz der Proben eindeutig, da die Proben, die mit Vildagliptin inkubiert wurden, niedrigere Mengen von IL6 produziert haben. Die Ergebnisse nach 24 Stunden Stimulation zeigten auch eine hemmende Wirkung bei den Proben, die mit Vildagliptin inkubiert wurden; und der Unterschied zwischen den Signalen der einzelnen Gruppen war statistisch signifikant ($P < 0,001$). Es ist bemerkenswert, dass sich zwischen der Kontrollgruppe und der mit Vildagliptin 10 μM -behandelten Gruppe (beide wurden mit Immunkomplexe stimuliert) ein signifikanter Unterschied ($P: 0,01$) ergab. Je höher die Dosis des Vildagliptins war, desto niedriger war die Produktion von IL6, folglich ist diese inhibitorische Wirkung des Vildagliptins auf die PMNS von der Dosierung des Wirkstoffes abhängig.

Kröller-Schön et al. haben schon den Einfluss der DPP-IV Inhibitoren auf die Freisetzung von ROS bei einem Rattenmodell beschrieben (Kröller-Schön et al. 2012). Sie haben männliche Wistar-Ratten (400 g; 4 Monate) verwendet, die i.p. mit 10 mg / kg LPS für 24 Stunden injiziert wurden, um einen septischen Schock zu induzieren. Die Versuchstiere wurden p.o. mit dem DPP-IV Hemmer Linagliptin behandelt und 7 Tage nach der Therapie mit Linagliptin und 24 Stunden nach der LPS-Injektion getötet. Danach wurden *in vitro* die Effekte von Sepsis mit der gleichzeitigen Therapie mit Linagliptin evaluiert. Ihre Ergebnisse zeigten eine antiinflammatorische und antioxidative Wirkung bei den Versuchstieren, die eine durch Linagliptin induzierte Sepsis entwickelten. Eine der verwendeten Methoden stellte die Auswertung der Freisetzung von ROS bei den Leukozyten dar, die aus dem Blut der Ratten isoliert wurden. Die Ergebnisse zeigten eine reduzierte Freisetzung von ROS bei den Versuchstieren, die mit Linagliptin behandelt wurden. Außerdem haben Kröller-Schön et al. die Wirkung von verschiedenen DPP-IV Inhibitoren bei der Freisetzung von ROS in Neutrophilen getestet, die aus humanem Blut isoliert wurden. Die getesteten Wirkstoffe waren sowohl Linagliptin, Alogliptin und Saxagliptin als auch Vildagliptin und Sitagliptin. Fast

alle Medikamente haben eine Reduktion der Bildung von ROS ausgelöst, aber der größte Effekt ist bei Linagliptin, Sitagliptin und Viladgliptin aufgetreten (Kröller-Schön et al. 2012). Lu et al. haben auch die Produktion von ROS bei U937 Zellen durch DPP-IV Inhibitoren gemessen (Lu et al. 2015). Die U937 Zellen gehören zu der Zelllinie der Monozyten und wurden für 1 Stunde mit GLP-1 behandelt. GLP-1 stellt ein Inkretin-Hormon dar, welches nach der Hemmung von DPP-IV einen erhöhten Blutspiegel zeigt und mit der antidiabetischen Wirkung der DPP-IV Hemmer verbunden ist. Die Zellen wurden nach der GLP-1-Inkubation mit Ang II (1 μ M) für 24 Stunden stimuliert. Danach wurde die zelluläre Fähigkeit der Produktion von ROS durch DCF-Fluoreszenz gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass Ang II-behandelte U937 Zellen eine starke ROS-Produktion im Vergleich mit Kontrollzellen aufweisen. Dennoch wurde diese erhöhte Wirkung verringert, wenn die Zellen mit verschiedenen Dosen von GLP-1 inkubiert wurden. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Inkubation mit GLP-1 der stimulierten Monozyten die Produktion der ROS herunterstufen konnte (Lu et al. 2015).

Unsere Ergebnisse, die auch eine verringerte Freisetzung von ROS durch den DPP-IV Inhibitoren Vildagliptin und Sitagliptin ergaben, stehen im Einklang mit den zuvor veröffentlichten Ergebnissen von den DPP-IV Inhibitoren und den GLP-1 Analogen. Die Produktion von ROS ist sehr eng mit der mitochondrialen Funktion und dem oxidativen Zustand der Zellen verbunden (Turrens 2003). Der Pathomechanismus der geringeren Freisetzung von ROS liegt eventuell an der Fähigkeit von DPP-IV Inhibitoren, die GLP-1 im Blutspiegel zu erhöhen. Insulinresistenz und mitochondriale Dysfunktion sind beide Merkmale des Diabetes mellitus Typ 2. Die mitochondriale Dysfunktion führt zu einer Beeinträchtigung der Insulin Empfindlichkeit durch eine geringere Aktivität der AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), welches ein sehr wichtiger zellulärer Regler ist. Sehr interessant ist es, dass GLP-1 die Aktivierung von AMPK stimuliert, was zu einer verringerten Produktion von ROS führt (Korneliues et al. 2015). Zusätzlich wurde auch eine AMPK-Aktivierung vorgeschlagen, um die Insulinempfindlichkeit von GLP-1-Agonisten zu verbessern. Weiterhin ist bekannt, dass Linagliptin die Funktion der Mitochondrien schützt und die intrazelluläre Akkumulation von ROS unterdrückt, die von den Insulin Signalwegen abhängt. Der DPP-IV Inhibitor Linagliptin kann die AMPK-Aktivierung auslösen, die zur Erhöhung der Produktion von Sirt1 und anschließend zur Auslösung von Superoxid-Dismutase (SOD) führt (Korneliues et al. 2015, Kitada et al. 2013, Balteau et al. 2014, Tanno et al. 2010). SOD ist ein

Antioxidansfaktor, der die mitochondriale Funktion verbessern und die Zellen vor der Freisetzung von ROS schützen kann (Turrens 2003).

Diese Ergebnisse zeigten, dass Vildagliptin in den verwendeten Konzentrationen eine hemmende Wirkung bei der Freisetzung von IL8 und IL6 aus den PMNs hervorrufen können und diese Hemmung von der Konzentration der DPP-IV Inhibitoren abhängig war. Diese Hemmung kann nicht aus einer möglichen schädlichen Wirkung der DPP-IV Inhibitoren bei den PMNs erklärt werden, da die Zellmenge nach 3 Stunden und 24 Stunden Stimulation zwischen Kontrollgruppe und der mit Vildagliptin behandelten Gruppen keinen signifikanten Unterschied gezeigt hat. Nach Stulc und Sedo spielen DPP-IV Inhibitoren eine entscheidende Rolle in der Pathogenese verschiedener entzündlicher Erkrankungen durch den proteolytischen Abbau von zahlreichen Chemokinen, Zytokinen und Neuropeptiden (Stulc and Sedo 2010).

Imai et al. haben die Konzentration von IL8 bei Patienten gemessen, die für 3 Monate mit einer Kombination von Sitagliptin und Mitglitol für die Therapie der Diabetes mellitus Typ 2 behandelt wurden (Imai et al. 2014). Mitglitol wirkt durch die Hemmung des Enzyms α -Glucosidase im Darm. Dadurch wird der Abbau von Polysacchariden in Einfachzucker in Abhängigkeit von der Dosis des Medikamentes verzögert und der Blutzucker steigt nach einer Mahlzeit nicht so schnell an. Sie haben das IL8 im Plasma von 32 Patienten gemessen und die Ergebnisse zeigten eine Reduktion von IL8 nach 3 Monaten durch diese kombinierte Behandlung (Imai et al. 2014).

Nach Arndt et al. hemmen die DPP-IV Inhibitoren auch die DNA-Synthese und die Produktion von Proteinen und unterschiedlichen Zytokinen. In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass mithilfe PBMC-Stimulation vom Blut gesunder Spender geringere Produktion von IL2 und IL12 und niedrige mRNA-Expression beobachtet wurde. Diese Hemmung war auch von der Dosierung der DPP-IV Inhibitoren abhängig; dies lag an der Zellzyklusarrest in G1-Phase des Zellzyklus aufgrund der verbesserten TGF-beta-1-Expression, die von der Hemmung des DPP-IV verursacht wurde (Arndt et al. 2000). Aufgrund des Zellzyklusarrestes in der G1-Phase könnte auch die geringere Produktion von IL8 aus den PMNs, die mit Vildagliptin inkubiert wurden, erklärt werden.

Makdissi et al. haben die Effekte der IL-6 Produktion im Plasma von Typ 2 Diabetikern unter Sitagliptin beschrieben (Makdissi et al. 2012). Die Blutentnahmen wurden vor der Therapie mit Sitagliptin und 2, 4, 8 und 12 Wochen nach der Therapie mit Sitagliptin durchgeführt. Von

insgesamt 22 Patienten wurden 12 mit 100 mg Sitagliptin behandelt und die anderen (10) wurden als Kontrollgruppe hinzugezogen. Die Freisetzung von IL6 wurde danach durch ELISA gemessen. Zu dem Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen wurde der two-way ANOVA Test durchgeführt; die Ergebnisse ergaben eine Reduktion in der Produktion von IL6 bei den mit Sitagliptin-behandelten Patienten, die zwischen den beiden Gruppen nach der 4. Woche statistisch signifikant ($P < 0,05$) war. Diese Wirkung ist ohne Gewichtsverlust aufgetreten und somit unabhängig von der Wirkung des Sitagliptins auf das Körpergewicht (Makdissi et al. 2012).

Zusätzlich haben Zeng et al. die Produktion von IL6 bei Apolipoprotein E-Knockout-Mäusen mit C57BL / 6 Hintergrund getestet, um die Entzündung in den Aorta-Geweben zu untersuchen (Zeng et al. 2014). Die Versuchstiere waren 24 männliche Mäuse im Alter von 8 Wochen und wurden zufällig in zwei Gruppen eingeteilt. Der Kontrollgruppe wurde eine fettreiche Diät mit einem Gehalt von 21,8% Fett, 42% Energie und 1,25% Cholesterin für 16 Wochen angeboten, während die Versuchsgruppe eine fettreiche Diät gemischt mit Sitagliptin in einer Endkonzentration von 0,3% (entsprechend 200 mg / kg / Tag) zur gleichen Zeit erhielt. Die Ergebnisse zeigten, dass keine signifikanten Unterschiede im Körpergewicht, der Nahrungsaufnahme oder dem Blutzuckerspiegel zwischen den beiden Gruppen während der Zeit des Experiments beobachtet wurden. Total RNA wurde aus den Aorta-Gewebender Mäuse extrahiert und für die Analyse des IL6 mithilfe der PCR verwendet. Sitagliptin konnte die Expression von IL-6 signifikant ($P: 0,033$) reduzieren und die Entzündung im Aorta-Gewebe hemmen. Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Studie war, dass Sitagliptin den AMPK-Signalweg aktivieren und die MAPK-Signalisierung durch die Phosphorylierung von AMPK inhibieren konnte. Auf der anderen Seite wurde die Phosphorylierung von p38 und ERK1 / 2-Reduktions MAPK in der Aorta reduziert. Außerdem verringerte Sitagliptin das serumlösliche VCAM-1 und P-Selektin, welches eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Bindung von Leukozyten mit Endothelzellen als erster Schritt bei der Entwicklung von Atherosklerose spielt und auch die Expression von IL-6 reduzieren kann (Zeng et al. 2014). Diese Ergebnisse stehen mit unseren Ergebnissen in Einklang.

2015 haben Hirakawa et al. die Expression von IL6, IL2, IL1- β und TNF- α von Herzzellen aus Mäusen, die vorher mit Linagliptin p.o. behandelt wurden, mittels RT-PCR beschrieben (Hirakawa et al. 2015). Die quantitative PCR-Analyse zeigte, dass die mRNA-Expression von IL-6, IL-2, IL-1 β und TNF- α in der mit Linagliptin behandelten Gruppe signifikant niedriger als in

der unbehandelten Gruppe war. Außerdem tendierte Linagliptin dazu, die mRNA-Spiegel von Alpha-1-Typ-I-Kollagen und Fibronectin im Vergleich zur Kontrolle-Gruppe zu reduzieren (Hirakawa et al. 2015). T-Helfer-1 (Th1) -Zytokine (z. B. IL-2 und TNF- α) sind an der Progression von autoimmuner Myokarditis beteiligt. Insbesondere hat TNF- α eine wichtige Rolle bei der Pathogenese einer autoimmunen Myokarditis. Die Blockade von TNF- α verbesserte den Entzündungsprozess bei experimentellen-autoimmunen Myokarditis –Mäusen (Hirakawa et al. 2015). Liu et al. zeigten, dass TNF- α eine kritische Rolle beim Abbau myokardialer, extrazellulärer Matrixkomponenten durch Hochregulierung von Matrixmetalloproteinasen spielen könnte (Liu et al. 2012). Die Myokardfibrose war bei transgenen Mäusen mit kardialer Überexpression von TNF- α deutlich erhöht (Sivasubramanian et al. 2001). Hirakawa et al. haben auch gezeigt, dass die Verabreichung von Linagliptin die Fibrose effektiv unterdrücken und IL-1 β und IL-6 in EAM-Mäusen reduzieren kann (Hirakawa et al. 2015). Da diese Zytokine als kritische Faktoren bei der Beschleunigung von EAM bekannt sind, hat Linagliptin die Fähigkeit, eine autoimmune Myokarditis-Entwicklung zu unterdrücken (Eriksson et al. 2003, Hirakawa et al. 2015). Darüber hinaus wurden Alpha-1-Typ-I-Kollagen und Fibronectin, die als pro-fibrotische Faktoren in verletzten Geweben bekannt sind, durch Linagliptin unterdrückt. Diese Daten deuten darauf hin, dass Linagliptin eine pleiotrope Wirkung auf Entzündung und Anti-Fibrose haben könnte. Neuere Studien zeigten, dass DPP-4-Inhibitoren eine hemmende Wirkung auf die Fibroblastenaktivität haben. Kanasaki et al. zeigte, dass Linagliptin die Nierenfibrose bei diabetischen Mäusen verbessern kann, ohne die Blutzuckerwerte zu verändern. Die therapeutischen Effekte von Linagliptin auf diabetische Nieren wurden mit der Suppression von profibrotischen Programmen assoziiert (Kanasaki et al. 2014). Zurzeit können die detaillierten Mechanismen nicht hinreichend erklärt werden, jedoch ist es möglich, dass Linagliptin eine neuartige pleiotrope Wirkung besitzt, die Entzündungen und Gewebsfibrose unterdrückt (Hirakawa et al. 2015).

Diese Wirkung könnte auf der Fähigkeit der DPP-IV Inhibitoren beruhen, die DNA-Synthese zu verhindern (Arndt et al. 2000). Es wurde schon beschrieben, dass eine niedrige mRNA-Produktion bei mit DPP-IV Inhibitoren inkubierten PBMC beobachtet wurde. Je höher die Dosierung der DPP-IV Inhibitoren war, desto niedriger fiel die mRNA-Produktion aus. Laut dieser Studie behindern die DPP-IV Inhibitoren den Zellzyklus in der G1-Phase, da die Hemmung des DPP-IV-Enzyms die Expression von TGF-beta-1 verstärkt. In der gleichen Weise

können DPP-IV Inhibitoren den Zellzyklus von PMNs in der G1-Phase anhalten und die Produktion von IL8 aus PMNs verringern.

4.4. Die Effekte der DPP-IV Inhibitoren bei passivem Mausmodell der EBA

Beim passiven Mausmodell der EBA wurden DPP-IV Inhibitoren durch orale Verabreichung getestet. Die Dosierung der DPP-IV Inhibitoren war 10 mg / kg; als Wirkstoff der DPP-IV Inhibitoren wurde Vildagliptin verwendet. Die Effekte der DPP-IV Inhibitoren bei Mäusen wurden klinisch ausgewertet und die Ergebnisse mithilfe two-way ANOVA Test analysiert, um sowohl die Effloreszenz der unterschiedlichen Gruppen als auch die klinische Bewertung jedes einzelnen Bewertungstags vergleichen zu können. Trotz der signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Tagen der Auswertung ($P < 0,001$) ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der mit Vildagliptin-behandelten Gruppe basierend auf dem Prozentsatz der betroffenen Körperoberfläche der Mäuse ($P: 0,357$). Bei dem Tierversuch konnte klinisch in den mit Vildagliptin-behandelten Mäusen eine statistisch nicht signifikant verstärkte EBA beobachtet werden. Diese statistisch nicht signifikanten Ergebnisse könnten aufgrund einer geringeren Anzahl von Versuchsmäusen begründet werden. Eine größere Anzahl von Mäusen könnte ggf. einen signifikanten Unterschied zeigen. Nach Drucker und Rosen et al. und Hogen et al. übt die pharmakologische Aktivierung von GLP-1-Rezeptoren eine entzündungshemmende Wirkung auf Hauterkrankungen aus (Drucker und Rosen, 2011; Hogan et al., 2011). Basierend auf diese Studie haben Schürmann et al. die Wirkung der DPP-IV Hemmer Linagliptin in dem Entzündungsprozess und der Epithelisierung von Wunden bei diabetischen ob / ob-Mäusen untersucht (Schürmann et al. 2012). Zunächst haben sie die Expression von DPP-IV bei nicht verwundeter Haut von gesunden (C57BL / 6J) sowie diabetischen (C57BL / 6J-ob / ob) Tieren untersucht. Sie führten eine immunhistochemische Färbung gegen DPP-IV-Protein in Hautgewebeschnitten durch, indem sie einen DPP-4-spezifischen Antikörper verwendeten. Es wurde gezeigt, dass DPP-IV von den epidermalen Keratinozyten und den dermalen Fibroblasten in gesunder Haut exprimiert wurde. Nach der Verletzung der Haut war die DPP-IV-Proteinexpression in gesunden Mäusen am ersten Tag hoch, aber am Tag 3 und 5 nach der Verletzung deutlich niedriger. Es ist bemerkenswert, dass die erhöhte Menge von DPP-IV am ersten Tag der Wunde gesunder Mäuse darauf hindeutet, dass die nachfolgende niedrige Menge von DPP-IV während des akuten Wund-Prozesses nicht einfach durch Gewebeverlust verursacht wurde. DPP-IV-Protein erschien wieder, wenn die Wundheilung über die akute und entzündliche Phase hinausging. Im Gegensatz war die DPP-IV-Expression in diabetischen ob / ob-Mäusen am

ersten bis fünften Tag nach der Verletzung der Haut nicht nachweisbar, trat jedoch ab Tag 7 nach Verletzung auf. Dieses Muster der DPP-IV-Expression zeigt, dass die Heilungsbedingungen bei gesunden und diabetischen ob / ob-Mäusen am 7. Tag nach der Verletzung unterschiedlich waren, obwohl das beobachtete Muster der DPP-IV-Expression am Tag 7 ähnlich war (Schürmann et al. 2012). Anschließend wurde der Epithelisierungsprozess durch die Hemmung von DPP-IV mittels Linagliptin untersucht. Die Hemmung der DPP-IV-Aktivität durch Linagliptin verbesserte den Prozess der Epithelisierung in Wunden bei ob / ob-Mäusen. Es wurde gezeigt, dass die Wundränder im Vergleich zu den Kontrollmäusen bei histologischer Beurteilung verringert waren. Es wurde auch gezeigt, dass mit Linagliptin behandelte ob / ob-Mäuse eine Verringerung der nicht-epithelisierten Wundflächen oder eine vollständige epitheliale Bedeckung der Verletzung aufwiesen. Schürmann et al. haben auch die Expression von α -SMA als Marker für die Differenzierung von Myofibroblasten bewertet. Die mit Linagliptin behandelten Mäuse zeigten am Tag 10 des Heilungsprozesses eine verstärkte Präsenz von Myofibroblasten im gesamten regenerierenden Gewebe (Schürmann et al. 2012). Um weiter die Anzahl der Immunzellen im Wundgewebe zu bestimmen, verwendeten Schürmann et al. die Expression verschiedener zellulärer Marker, die auf polymorphkernige Neutrophile (PMN) oder Makrophagen beschränkt waren. Die Oberflächenmarker Ly6-G / Gr-1 (für PMN) (Daley et al., 2008) und F4 / 80 (für Makrophagen) (Austyn und Gordon, 1981) repräsentieren exprimierte Oberflächenantigene, die spezifisch für die oben genannten Arten von Immunzellen sind. Diese Marker ermöglichen die biochemische Quantifizierung der jeweiligen Zellzahlen in der Wunde (Wetzler et al., 2000; Goren et al., 2003, 2009a; Seitz et al., 2010). Die Wunden von Kontroll ob / ob-Mäusen zeigten eine hohe Anzahl von PMN. Auf der anderen Seite wiesen die Wunden bei mit Linagliptin-behandelten ob / ob-Mäusen eine viel geringere PMN-Infiltration auf. Immunoblots von Wundlysaten gegen PMN-spezifisches Gr-1-Protein bestätigten die beobachtete Reduktion von PMN in Wunden nach Linagliptin-Behandlung. Im Gegensatz zu den PMN-Daten zeigten sich histologisch und immunologisch eine gleiche Anzahl von Makrophagen in Wunden von Kontrolle und Linagliptin-behandelten Mäusen. Schürmann et al. haben auch gezeigt, dass Linagliptin eine Herunterregulierung der Proteinexpression von Cox-2 und MIP-2 induzierte (Schürmann et al. 2012). Cox-2 und MIP-2 werden bei Verletzung schnell induziert und dienen als molekulare Marker für akute Wundentzündungen. Diese Marker sind keine direkten Ziele der Linagliptin-Wirkung, sondern

zeigen chronisch beeinträchtigte Wundzustände an. Eine anhaltend erhöhte Expression dieser entzündungsfördernden Moleküle (Goren et al., 2003; Seitz et al., 2010) wurde bei diabetischen Hautwunden von ob / ob-Mäusen beobachtet. Die Herunterregulierung von Cox-2 und MIP-2 durch Linagliptin in Gegenwart von unveränderten Spiegeln der jeweiligen mRNA-Spezies deutet auf einen posttranskriptionellen Effekt auf die Cox-2- und MIP-2-Genexpression hin. Die durch Linagliptin induzierte Abnahme der Cox-2- und MIP-2-Expression kann für den Verlust von PMN-Infiltrat verantwortlich sein, der bei der Behandlung mit Linagliptin beobachtet wird (Schürmann et al. 2012).

Im Vergleich zu unserer Studie, in welcher Vildagliptin als DPP-IV Inhibitor verwendet wurde, haben Schürmann et al. den DPP-IV Inhibitor Linagliptin getestet. Beide Medikamente wirken durch das Enzym Dipeptidylpeptidase-IV, welches den Abbau des Hormons Glucagon hemmt. Außerdem haben Schürmann et al. gesunde (C57BL / 6J) sowie diabetische (C57BL / 6J-ob / ob) Tiere untersucht. Die Mäuse, die bei uns untersucht wurden, waren gesunde C57BL / 6J Mäuse, die mit isolierten spezifischen mcol7c IgG von Kaninchen immunisiert wurden. Daher haben alle Mäuse EBA entwickelt; die Hälfte davon würde mit Vildagliptin behandelt während die andere Hälfte PBS als Kontrolle erhielten. Die Mäuse, die bei uns getestet wurden, waren keine diabetischen C57BL / 6J-ob / ob Mäuse. Die DPP-IV Inhibitoren sind Medikamente für Patienten mit Diabetes mellitus; Patienten, die BP durch DPP-IV Inhibitoren entwickelt haben, hatten alle Diabetes mellitus. Hypothetisch könnte man denken, dass falls unsere Tiere Diabetes mellitus gehabt hätten, die Ergebnisse anders aussehen würden. Das könnte eine Idee für eine zukünftige Studie sein, um die klinische Realität genauer zu simulieren.

4.5 Ausblick

Es gibt eine große Zahl von Studien, die über den Zusammenhang zwischen BP und Gliptinaufnahme berichten (Lindgren et al. 2019, Varpuluoma et al. 2018, Plaquet et al. 2019, Saleme et al. 2022). In den neuesten Studien wird berichtet, dass Gliptin-assoziiertes BP mehrere spezifische Merkmale aufweist. Dieser „nicht entzündliche“ Phänotyp des BP zeigt kleinere Blasen, mildes ausgeprägtes Erythem und begrenzte Verteilung von Hautläsionen. Zusätzlich weist dieser Phänotyp auf eine starke Assoziation mit dem HLA-DQB1*03:01-Allel sowie auf Autoantigene, die auf verschiedene immundominante Epitope in BP180 abzielen, hin (Lindgren et al. 2019, Ujiie et al. 2018). Izumi et al. berichten auch über BP-Fälle mit einem nichtentzündlichen Phänotyp, bei denen Autoantikörper spezifisch auf den mittleren Teil des Kollagens XVII anstatt auf NC16A abzielten. Diese Patienten zeigten ein reduziertes Erythem, welches mit einer geringen Infiltration von Eosinophilen verbunden war. Die Hälfte dieser Patienten erhielt DPP-IV-Hemmer zur Behandlung von Diabetes mellitus (Izumi et al. 2016). Ihre Ergebnisse sowie die Ergebnisse von Chijiwa et al. bestätigen auch, dass die verringerte Infiltration von Eosinophilen in der Haut bei durch DPP-IV-Hemmer-assoziiertem BP charakteristisch ist (Izumi et al. 2016, Chijiwa et al. 2018). Es gab keinen signifikanten Unterschied im Bullous Pemphigoid Disease Area Index zwischen DPP-IV-Inhibitor-bezogenen BP-Patienten und nicht-DPP-IV-Inhibitor-bezogenen BP-Patienten (Izumi et al. 2016, Chijiwa et al. 2018). Die einzige Ausnahme ist der Erosions- / Blasen-Score der Schleimhaut. Labortests ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen den DPP-IV-Inhibitor-assoziiertem BP und nicht-DPP-IV-Inhibitor-assoziierten BP hinsichtlich der Gesamtzahl der weißen Blutkörperchen, der Eosinophilen, der Neutrophilen und des Titers des Anti-BP180-Antikörpers (Chijiwa et al. 2018). Die CRP-Werte im Serum von Patienten mit DPP-IV-Inhibitor-assoziiertem BP waren höher als bei Patienten mit nicht DPP-IV-Inhibitor-assoziiertem BP. Einige Patienten litten jedoch zum Beispiel gleichzeitig an einer zweiten bakteriellen Infektion der Haut oder der Harnwege; daher spiegelten die erhöhten CRP-Werte im Serum nicht unbedingt die BP induzierte systemische Entzündung wider (Izumi et al. 2016). Dennoch gibt es laut anderen europäischen Studien keine größeren Unterschiede zwischen Gliptin-assoziierten BP-Patienten und idiopathischem BP (Lindgren et al. 2019, Saleme et al. 2022).

Unsere *in vitro* Ergebnisse zeigen eine hemmende Wirkung, nicht nur bei der Sekretion von ROS sondern auch bei der Expression von IL8 und IL6 durch Gliptine mithilfe der ELISA und der Echtzeit-PCR. Im Gefrierschnittmodell wurde keine Wirkung nach der Inkubation mit DPP-IV Inhibitoren beobachtet. Es wurde auch keine Wirkung bei den *in vivo* Experimenten im passiven Mausmodell der EBA nach der Therapie mit Gliptine beobachtet. Daher kommen wir zum Schluss, dass DPP-IV Inhibitoren keine Wirkung auf die Effektor Phase der bullösen Pemphigoide auslösen.

Es ist derzeit unklar, ob es sich bei DPP-IV-Inhibitoren, die mit BP assoziiert sind, um ein tatsächlich arzneimittelinduziertes BP handelt, das sich nach Absetzen des Arzneimittels auflöst, oder vielmehr um einen durch Arzneimittel verschlimmerten BP, welches trotz Absetzen der DPP-IV Inhibitoren bestehen bleibt (Varpuluoma et al. 2018). Die Hemmung der CD26-Expression auf T-Zellen kann bestimmte Auswirkungen auf das Immunsystem haben. Es wurde berichtet, dass Vildagliptin und Sitagliptin Polyarthritits auslösen (Saito et al. 2013, Crickx et al. 2014). Es wurde aber auch erwogen, ob Linagliptin und Saxagliptin das Risiko für Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel rheumatoide Arthritis, systemischen Lupus erythematodes, Multiple Sklerose und Psoriasis verringern können (Kim et al. 2015, Varpuluoma et al. 2018).

BP180 ist ein Transmembrankollagen; daher können bestimmte Wirkungen von DPP-IV-Inhibitoren an die Aufhebung der Immuntoleranz von BP180 beteiligt sein. Eine vor kurzem durchgeführte Studie fand keine signifikanten Auswirkungen von DPP-IV-Inhibitoren auf die Expression oder den Abbau von BP180 in Keratinozyten *in vitro* (Tasanen et al. 2019, Lindgren et al. 2019). DPP-IV ist auch ein Plasminogen-Rezeptor auf der Zelloberfläche, der Plasminogen in Plasmin umwandelt. Plasmin spaltet das BP180 in seine 120- und 97-kD-Ektodomänen. Daher kann die Unterdrückung von DPP-IV mit der Entwicklung von Epitopen für die BP-Autoantikörper verbunden sein, was durch zukünftige Studien aufgeklärt werden muss (Tasanen et al. 2019).

Es ist merkwürdig, dass die Immuntoleranz gegenüber BP180 bei bestimmten Personen durch DPP-IV-Inhibitoren selektiv gebrochen wird, insbesondere bei japanischen HLA-DQB1 * 03:01-Trägern (Ujii et al. 2018).

Außerdem wurde 1988 die Lokalisierung des Enzyms DPP-IV an der Oberfläche von Maus-Fibroblasten beschrieben und die Beteiligung dieses Enzyms bei der Interaktion zwischen Kollagen und Zellen bewiesen (Bauvois 1988). Zusätzlich wurde von Thielitz et al. dargestellt,

dass die Aktivität des DPP-IV-Enzyms sich an der Regelung der Funktionen der Haut-Fibroblasten beteiligt und eine Hemmung von DPP-IV-Aktivität pathologische Veränderungen der Funktionen von Fibroblasten induziert (Thielitz et al. 2008). Die Inhibitoren der DPP-IV Aktivität beeinflussen das Zellwachstum und die Produktion der Zytokine und wurden für die Behandlung von Stoffwechsel-, Autoimmun- und Entzündungskrankheiten untersucht. Sie verringern signifikant die TGF- β 1-Expression und -Sekretion des C-terminalen Peptids von Prokollagen Typ I in Überständen beider Zelltypen. Darüber hinaus heben sie die TGF- β 1-induzierte Stimulation der Kollagensynthese, der Matrixablagerung und der TGF- β 1- und Fibronectinexpression auf. Beide Inhibitoren führen zur Dephosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen pp38 und pERK1 / 2, die bei TGF- β 1-Stimulation aktiviert werden und an der Fibrogenese beteiligt sind (Thielitz et al. 2008).

Eine weitere Frage ist, ob DPP-IV-Inhibitoren alleine ausreichen, um das BP zu induzieren, oder ob auch andere Faktoren beteiligt sind. Es ist derzeit nicht bekannt, ob begleitende Autoimmunerkrankungen das Risiko für BP bei mit Gliptin behandelten Diabetikern erhöhen. Bei BP wurden bereits verschiedene andere auslösende Faktoren beschrieben wie beispielsweise Medikamente; Infektionen, UV-Exposition und physikalische Faktoren wie Verbrennungen (Lo Schiavo et al. 2013). Interessanterweise gibt es einen Bericht darüber, dass BP durch eine thermische Verbrennung bei einem Patienten induziert wurde, der einen DPP-IV-Hemmer erhielt. In diesem Fall führte das Absetzen des DPP-IV-Hemmer zu einer kompletten Remission (Mai et al. 2018). Der Bericht legt nahe, dass die Behandlung mit DPP-IV-Inhibitor das BP-Risiko erhöht. Die Ergebnisse einer französischen Studie deuteten auch darauf hin, dass eine Behandlung mit DPP-IV-Inhibitor BP auslösen, aber nicht induzieren kann (Plaquest et al. 2019, Tanasen et al. 2019).

Zum Schluss zeigen die Ergebnisse von Saleme et al., dass bei mit Gliptin-assoziiertes BP-Patienten die humoralen IgG-, IgE- und IgA-Reaktionen auf die BP180- und BP230-Antigene abgeschwächt sind und das zirkulierende IgG auf andere BP180-Epitope als NC16A abzielt (Saleme et al. 2022). Iter vorzuheben ist die signifikante Reaktivität gegenüber E-1080 und E-1331 (Saleme et al. 2022).

Für zukünftige Studien ist der Fokus auf die Wirkung der DPP-IV Inhibitoren in Relation zu den Funktionen von Kollagen Typ XVII und Fibroblasten, die Epitopen E-1080 und E-1331, sowie auf die folgende HLA-Allele: HLA-DQB1 * 03:01, -DQA1 * 05:05, -DRB1 * 11:01 und -DRB1 * 12:01, HLA-DQA1 * 01:03 und -DQB1 * 06:01 zu richten.

5. Zusammenfassung

Beim bullösen Pemphigoid handelt es sich um eine heterogene Gruppe von seltenen Erkrankungen, die sich durch Autoantikörper gegen verschiedene Proteine der Hemidesmosomen der Haut und Schleimhäute auszeichnen. Die Pathogenese der Pemphigoid Erkrankungen ist zurzeit nicht ausreichend geklärt. Die Auslösung bullöser Pemphigoide ist u.a. mit der Einnahme von bestimmten Medikamenten assoziiert worden. In einer Reihe von publizierten Studien wird berichtet, dass DPP-IV Inhibitoren blasenbildete Autoimmundermatosen und besonders BP auslösen. Es wurde auch beschrieben, dass nach Absetzen des suspekten Medikaments eine Reduktion des Hautausschlages beobachtet wurde. DPP-IV Inhibitoren (auch bekannt als Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase-IV oder Gliptine) stellen eine relativ neue Wirkstoffklasse unter den Antidiabetika dar, die für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 von großer Bedeutung sind.

In der Haut exprimieren viele Zelltypen, einschließlich Keratinozyten, das Protein DPP-IV. Die DPP-IV Sekretion aus diesen Zellen kann zur Zytokin-Produktion und zum Kollagenstoffwechsel beitragen. Außerdem können DPP-IV Inhibitoren sowohl die adaptive als auch die angeborene Immunität beeinflussen. Zu diesen Mechanismen gehören proteolytischer Abbau von bioaktiven Molekülen sowie zahlreichen Chemokinen, Zytokinen und Neuropeptiden, die oft eine entscheidende Rolle in der Pathogenese verschiedener entzündlicher Erkrankungen spielen.

In dieser Arbeit wurden die molekularen Mechanismen der Auslösung bullöser Pemphigoide durch die DPP-IV-Inhibitoren untersucht. Dies erfolgte durch verschiedene Methoden, die sowohl *in vitro* und als auch *in vivo* die Effektor Phase der Pemphigoid-Erkrankungen verfolgen. Darüber hinaus sind Gefrierschnittmodelle verwendet worden. Außerdem wurden sowohl reaktive Sauerstoffradikale (ROS) von aktivierten Granulozyten mithilfe Chemilumineszenz im ROS-Release, als auch die Expression von IL6 und IL8 mithilfe des ELISA und der Echtzeit-PCR untersucht. Diese Methoden simulieren die Abfolge der Ereignisse, die zur Blasenbildung der Haut bei bullösem Pemphigoid führen. Außerdem wurde das Autoantikörpertransfer-(passiv)-Mausmodell der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) herangezogen, das als ein prototypisches Modell des BP gilt. Die kombinierte Verwendung dieser Methoden kann die Rolle der DPP-4 in der Effektor Phase der Pathogenese pemphigoider Erkrankungen aufklären.

Unsere *in vitro* Ergebnisse zeigen eine hemmende Wirkung durch Gliptine, die nicht nur bei der Sekretion von ROS sondern auch bei der Expression von IL8 und IL6 mithilfe der ELISA und der Echtzeit-PCR festgestellt werden konnte. Auf der anderen Seite konnten wir nach der Inkubation mit DPP-IV Inhibitoren keine Wirkung im Gefrierschnittmodell beobachten. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass DPP-IV Inhibitoren keine Wirkung auf die Effektor Phase der bullösen Pemphigoide besitzen.

DPP-IV Inhibitoren können auf das Kollagen und die Fibroblasten in der Haut von Diabetes-Patienten wirken. Es ist bekannt, dass das Enzym DPP-IV sich in der Oberfläche von Fibroblasten befindet und dieses eine wichtige Rolle bei der Regelung der Funktionen der Haut-Fibroblasten und Kollagen innehat. Die Inhibierung des DPP-IV Enzyms kann auch pathologische Veränderungen der Funktion von Fibroblasten induzieren. Außerdem sind bei Gliptin-assoziierten BP-Patienten die humoralen IgG-, IgE- und IgA-Reaktionen auf die BP180- und BP230-Antigene abgeschwächt, und das zirkulierende IgG zielt auf andere BP180-Epitope als NC16A ab. Darüber hinaus sollten weitere Versuche auf die Wirkung der DPP-IV Inhibitoren gegenüber pathologischen Veränderungen der Funktionen von Kollagen Typ XVII und Fibroblasten, auf die signifikante Reaktivität gegenüber E-1080 und E-1331, als auch auf die folgenden HLA-Allele: HLA-DQB1 * 03:01, -DQA1 * 05:05, -DRB1 * 11:01 und -DRB1 * 12:01, HLA-DQA1 * 01:03 und -DQB1 * 06:01 fokussiert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Albuquerque RP, Hara R, Prado J, Schiavo L, Giordano V, do Amaral NP. Epidemiological study on tibial plateau fractures at a level I trauma center. *Acta Ortop Bras.* 2013 Mar;21(2):109-15. Epub 2014/01/24.
2. Amber KT, Bloom R, Zhou Y, et al. Mast cell infiltration and local TIM-3 expression in a murine model of bullous pemphigoid. *Exp Dermatol.* 2019;28(3):331-337. doi:10.1111/exd.13823.
3. Anhalt GJ, Diaz LA. Animal models for bullous pemphigoid. *Clin Dermatol.* 1987 Jan-Mar;5(1):117-25. Epub 1987/01/01.
4. Antoine JC, Maurice M, Feldmann G, Avrameas S. In vivo and in vitro effects of colchicine and vinblastine on the secretory process of antibody-producing cells. *J Immunol.* 1980 Nov;125(5):1939-49. Epub 1980/11/01.
5. Arndt M, Reinhold D, Lendeckel U, Spiess A, Faust J, Neubert K, et al. Specific inhibitors of dipeptidyl peptidase IV suppress mRNA expression of DP IV/CD26 and cytokines. *Adv Exp Med Biol.* 2000;477:139-43. Epub 2000/06/13.
6. Attaway A, Mersfelder TL, Vaishnav S, Baker JK. Bullous pemphigoid associated with dipeptidyl peptidase IV inhibitors. A case report and review of literature. *J Dermatol Case Rep.* 2014 Mar 31;8(1):24-8. Epub 2014/04/22.
7. Austyn JM, Gordon S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol.* 1981 Oct;11(10):805-15. Epub 1981/10/01.
8. Balteau M, Van Steenberghe A, Timmermans AD, Dessy C, Behets-Wydemans G, Tajeddine N, et al. AMPK activation by glucagon-like peptide-1 prevents NADPH oxidase activation induced by hyperglycemia in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014 Oct 15;307(8):H1120-33. Epub 2014/08/17.

9. Bastuji-Garin S, Joly P, Lemordant P, Sparsa A, Bedane C, Delaporte E, et al. Risk factors for bullous pemphigoid in the elderly: a prospective case-control study. *J Invest Dermatol*. 2011 Mar;131(3):637-43. Epub 2010/10/15.
10. Bauer EA, Valle KJ. Colchicine-induced modulation of collagenase in human skin fibroblast cultures. I. Stimulation of enzyme synthesis in normal cells. *J Invest Dermatol*. 1982 Dec;79(6):398-402. Epub 1982/12/01.
11. Bauvois B. A collagen-binding glycoprotein on the surface of mouse fibroblasts is identified as dipeptidyl peptidase IV. *Biochem J*. 1988 Jun 15;252(3):723-31. Epub 1988/06/15.
12. Bedane C, McMillan JR, Balding SD, Bernard P, Prost C, Bonnetblanc JM, et al. Bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid autoantibodies react with ultrastructurally separable epitopes on the BP180 ectodomain: evidence that BP180 spans the lamina lucida. *J Invest Dermatol*. 1997 Jun;108(6):901-7. Epub 1997/06/01.
13. Bene J, Jacobsoone A, Coupe P, Auffret M, Babai S, Hillaire-Buys D, et al. Bullous pemphigoid induced by vildagliptin: a report of three cases. *Fundam Clin Pharmacol*. 2015 Feb;29(1):112-4. Epub 2014/05/28.
14. Bene J, Moulis G, Bennani I, Auffret M, Coupe P, Babai S, et al. Bullous pemphigoid and dipeptidyl peptidase IV inhibitors: A case-noncase study in the French pharmacovigilance database. *Br J Dermatol* 2016;175: 296-301.
15. Benzaquen M, Borradori L, Berbis P, Cazzaniga S, Valero R, Richard M, et al. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitors, a risk factor for bullous pemphigoid. Retrospective multicenter casecontrol study in France and Switzerland (e-pub ahead of print). *J Am Acad Dermatol* 2017; <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.12.038> (accessed 20 December 2017).

16. Bernard P, Bedane C, Maza A, Bonnetblanc JM. Prognostic factors in bullous pemphigoid: a retrospective study of 168 patients. *Arch Dermatol*. 1995;131(5):535-541. doi:10.1001/archderm.1995.01690170039006
17. Bernard P, Antonicelli F, Bedane C, Joly P, Le Roux-Villet C, Duvert Lehembre S, et al. Bullous pemphigoid: a review of its diagnosis, associations and treatment. *Am J Clin Dermatol*. 2017 Aug;18(4):513-528. doi: 10.1007/s40257-017-0282-6. PMID: 28341964.
18. Bertram F, Brocker EB, Zillikens D, Schmidt E. Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2009 May;7(5):434-40. Epub 2009/01/28.
19. Borradori L, Sonnenberg A. Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol*. 1999 Apr;112(4):411-8. Epub 1999/04/14.
20. Borrego L, Maynard B, Peterson EA, George T, Iglesias L, Peters MS, et al. Deposition of eosinophil granule proteins precedes blister formation in bullous pemphigoid. Comparison with neutrophil and mast cell granule proteins. *Am J Pathol*. 1996 Mar;148(3):897-909. Epub 1996/03/01.
21. Briggaman RA, Wheeler CE, Jr. The epidermal-dermal junction. *J Invest Dermatol*. 1975 Jul;65(1):71-84. Epub 1975/07/11.
22. Busso N, Wagtmann N, Herling C, Chobaz-Peclat V, Bischof-Delaloye A, So A, et al. Circulating CD26 is negatively associated with inflammation in human and experimental arthritis. *Am J Pathol*. 2005 Feb;166(2):433-42. Epub 2005/02/01.
23. Campos M, Silvente C, Lecona M, Suarez R, Lazaro P. Epidermolysis bullosa acquisita: diagnosis by fluorescence overlay antigen mapping and clinical response to high-dose intravenous immunoglobulin. *Clin Exp Dermatol*. 2006 Jan;31(1):71-3. Epub 2005/11/29.

24. Campos M, Silvente C, Lecona M, Suarez R, Lazaro P. Epidermolysis bullosa acquisita: diagnosis by fluorescence overlay antigen mapping and clinical response to high-dose intravenous immunoglobulin. *Clin Exp Dermatol*. 2006 Jan;31(1):71-3. Epub 2005/11/29.
25. Chan YC, Sun YJ, Ng PP, Tan SH. Comparison of immunofluorescence microscopy, immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay methods in the laboratory diagnosis of bullous pemphigoid. *Clin Exp Dermatol*. 2003 Nov;28(6):651-6. Epub 2003/11/18.
26. Chen D, McKearin D. Dpp signaling silences bam transcription directly to establish asymmetric divisions of germline stem cells. *Curr Biol*. 2003 Oct 14;13(20):1786-91. Epub 2003/10/17.
27. Chen M, Marinkovich MP, Jones JC, O'Toole EA, Li YY, Woodley DT. NC1 domain of type VII collagen binds to the beta3 chain of laminin 5 via a unique subdomain within the fibronectin-like repeats. *J Invest Dermatol*. 1999 Feb;112(2):177-83. Epub 1999/02/16.
28. Chijiwa C, Takeoka S, Kamata M, Tateishi M, Fukaya S, Hayashi K, et al. Decrease in eosinophils infiltrating into the skin of patients with dipeptidyl peptidase-4 inhibitor-related bullous pemphigoid. *J Dermatol*. 2018 May;45(5):596-9. Epub 2018/02/08.
29. Chiriac MT, Roesler J, Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K, Zillikens D, Sitaru C. NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *J Pathol*. 2007 May;212(1):56-65. Epub 2007/03/24.
30. Chiriac MT, Roesler J, Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K, Zillikens D, Sitaru C. NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *J Pathol*. 2007 May;212(1):56-65. Epub 2007/03/24.

31. Cho HJ, Lee IJ, Kim SC. Complement-fixing abilities and IgG subclasses of autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita. *Yonsei Med J.* 1998 Aug;39(4):339-44. Epub 1998/09/30.
32. Christopherson KW, Cooper S, Hango G, Broxmeyer HE. CD26 is essential for normal G-CSF-induced progenitor cell mobilization as determined by CD26^{-/-} mice. *Exp Hematol.* 2003 Nov;31(11):1126-34. Epub 2003/10/31.
33. Clement M, Ratnesar P, Thirumorthy T, McGrath J, Black MM. Epidermolysis bullosa acquisita--a case with upper airways obstruction requiring tracheostomy and responding to cyclosporin. *Clin Exp Dermatol.* 1993 Nov;18(6):548-51. Epub 1993/11/01.
34. Courville P, Kupfer I, Gilbert D, Thomine E, Metayer J, Joly P. [Evaluation of histological criteria for bullous pemphigoid. Correlation with antigens recognized by immunoblotting of anti-epidermal autoantibodies]. *Ann Pathol.* 2000 Dec;20(6):564-9. Epub 2001/01/10.
35. Crickx E, Marroun I, Veyrie C, Le Beller C, Schoindre Y, Bouilloud F, et al. DPP4 inhibitor-induced polyarthritis: a report of three cases. *Rheumatol Int.* 2014 Feb;34(2):291-2. Epub 2013/03/07.
36. Cunningham BB, Kirchmann TT, Woodley D. Colchicine for epidermolysis bullosa acquisita. *J Am Acad Dermatol.* 1996 May;34(5 Pt 1):781-4. Epub 1996/05/01.
37. Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol.* 2008 Jan;83(1):64-70. Epub 2007/09/22.
38. Dore MP, Villanacci V, Manca A, Soro S, Schiavo-Lena M, Sabatino G, et al. Cherry-tree colon: colonoscopic appearance suggesting drug-induced mucosal injury. *Intern Emerg Med.* 2014 Jun;9(4):405-9. Epub 2013/03/16.

39. Drucker DJ, Rosen CF. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists, obesity and psoriasis: diabetes meets dermatology. *Diabetologia*. 2011 Nov;54(11):2741-4. Epub 2011/09/06.
40. Ehrenfeld M, Levy M, Bar Eli M, Gallily R, Eliakim M. Effect of colchicine on polymorphonuclear leucocyte chemotaxis in human volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 1980 Sep;10(3):297-300. Epub 1980/09/01.
41. Endo Y, Tamura A, Ishikawa O, Miyachi Y, Hashimoto T. Psoriasis vulgaris coexistent with epidermolysis bullosa acquisita. *Br J Dermatol*. 1997 Nov;137(5):783-6. Epub 1998/02/12.
42. Engineer L, Ahmed AR. Emerging treatment for epidermolysis bullosa acquisita. *J Am Acad Dermatol*. 2001 May;44(5):818-28. Epub 2001/04/20.
43. Eriksson U, Kurrer MO, Schmitz N, Marsch SC, Fontana A, Eugster HP, et al. Interleukin-6-deficient mice resist development of autoimmune myocarditis associated with impaired upregulation of complement C3. *Circulation*. 2003 Jan 21;107(2):320-5. Epub 2003/01/23.
44. Feliciani C, Toto P, Amerio P, et al. Inflammation and apoptosis in pemphigus and bullous pemphigoid. *Autoimmunity*. 2005;38(7):507-512. doi:10.1080/08916930500117890.
45. Filippatos TD, Athyros VG, Elisaf MS. The pharmacokinetic considerations and adverse effects of DPP-4 inhibitors [corrected]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014 Jun;10(6):787-812. Epub 2014/04/22.
46. Fine JD, Tyring S, Gammon WR. The presence of intra-lamina lucida blister formation in epidermolysis bullosa acquisita: possible role of leukocytes. *J Invest Dermatol*. 1989 Jan;92(1):27-32. Epub 1989/01/01.

47. Försti AK, Jokelainen J, Timonen M, Tasanen K. Increasing incidence of bullous pemphigoid in northern Finland: a retrospective database study in Oulu University Hospital. *Br J Dermatol* 2014;171:1223-6.
48. Funari R, Della Ventura B, Schiavo L, Esposito R, Altucci C, Velotta R. Detection of parathion pesticide by quartz crystal microbalance functionalized with UV-activated antibodies. *Anal Chem*. 2013 Jul 2;85(13):6392-7. Epub 2013/06/01.
49. Gammon WR. Immune complex and complement-mediated leukocyte recruitment in bullous pemphigoid. *Immunol Ser*. 1989;46:509-25. Epub 1989/01/01.
50. Gammon WR, Briggaman RA. Epidermolysis bullosa acquisita and bullous systemic lupus erythematosus. Diseases of autoimmunity to type VII collagen. *Dermatol Clin*. 1993 Jul;11(3):535-47. Epub 1993/07/01.
51. Gammon WR, Briggaman RA, Inman AO, 3rd, Queen LL, Wheeler CE. Differentiating anti-lamina lucida and anti-sublamina densa anti-BMZ antibodies by indirect immunofluorescence on 1.0 M sodium chloride-separated skin. *J Invest Dermatol*. 1984 Feb;82(2):139-44. Epub 1984/02/01.
52. Gammon WR, Heise ER, Burke WA, Fine JD, Woodley DT, Briggaman RA. Increased frequency of HLA-DR2 in patients with autoantibodies to epidermolysis bullosa acquisita antigen: evidence that the expression of autoimmunity to type VII collagen is HLA class II allele associated. *J Invest Dermatol*. 1988 Sep;91(3):228-32. Epub 1988/09/01.
53. Gammon WR, Merritt CC, Lewis DM, Sams WM, Jr., Carlo JR, Wheeler CE, Jr. An in vitro model of immune complex-mediated basement membrane zone separation caused by pemphigoid antibodies, leukocytes, and complement. *J Invest Dermatol*. 1982 Apr;78(4):285-90. Epub 1982/04/01.
54. Gandhi K, Chen M, Aasi S, Lapiere JC, Woodley DT, Chan LS. Autoantibodies to type VII collagen have heterogeneous subclass and light chain compositions and their

- complement-activating capacities do not correlate with the inflammatory clinical phenotype. *J Clin Immunol.* 2000 Nov;20(6):416-23. Epub 2001/02/24.
55. Garcia M, Aranburu MA, Palacios-Zabalza I, Lertxundi U, Aguirre C. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitors induced bullous pemphigoid: a case report and analysis of cases reported in the European pharmacovigilance database. *J Clin Pharm Ther* 2016;41:368-70.
56. Ghohestani RF, Novotney J, Chaudhary M, Agah RS. Bullous pemphigoid: from the bedside to the research laboratory. *Clin Dermatol.* 2001 Nov-Dec;19(6):690-6. Epub 2001/11/14.
57. Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA. Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J Invest Dermatol.* 1992 Sep;99(3):243-50. Epub 1992/09/01.
58. Giudice GJ, Emery DJ, Zelickson BD, Anhalt GJ, Liu Z, Diaz LA. Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Immunol.* 1993 Nov 15;151(10):5742-50. Epub 1993/11/15.
59. Gotoh H, Hagihara M, Nagatsu T, Iwata H, Miura T. Activities of dipeptidyl peptidase II and dipeptidyl peptidase IV in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Chem.* 1989 Jun;35(6):1016-8. Epub 1989/06/01.
60. Gourgiotou K, Exadaktylou D, Aroni K, Rallis E, Nicolaidou E, Paraskevakou H, et al. Epidermolysis bullosa acquisita: treatment with intravenous immunoglobulins. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2002 Jan;16(1):77-80. Epub 2002/04/16.
61. Gudi VS, White MI, Cruickshank N, Herriot R, Edwards SL, Nimmo F, et al. Annual incidence and mortality of bullous pemphigoid in the Grampian Region of North-east Scotland. *Br J Dermatol.* 2005 Aug;153(2):424-7. Epub 2005/08/10.

62. Gupta AK, Ellis CN, Cooper KD, Nickoloff BJ, Ho VC, Chan LS, et al. Oral cyclosporine for the treatment of alopecia areata. A clinical and immunohistochemical analysis. *J Am Acad Dermatol*. 1990 Feb;22(2 Pt 1):242-50. Epub 1990/02/01.
63. Hallel-Halevy D, Nadelman C, Chen M, Woodley DT. Epidermolysis bullosa acquisita: update and review. *Clin Dermatol*. 2001 Nov-Dec;19(6):712-8. Epub 2001/11/14.
64. Hammers CM, Schmidt E, Zillikens D. [Autoimmune blistering skin diseases: diagnostic and therapeutic approach]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2014 Jul;139(28-29):1473-7. Epub 2014/07/02.
65. Harada M, Yoneda A, Haruyama S, Yabuki K, Honma Y, Hiura M, et al. Bullous Pemphigoid Associated with the Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Sitagliptin in a Patient with Liver Cirrhosis Complicated with Rapidly Progressive Hepatocellular Carcinoma. *Intern Med*. 2017 Sep 15;56(18):2471-4. Epub 2017/08/22.
66. Harman KE, Black MM. High-dose intravenous immune globulin for the treatment of autoimmune blistering diseases: an evaluation of its use in 14 cases. *Br J Dermatol*. 1999 May;140(5):865-74. Epub 1999/06/03.
67. Harvath L, Yancey KB, Katz SI. Selective inhibition of human neutrophil chemotaxis to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine by sulfones. *J Immunol*. 1986 Aug 15;137(4):1305-11. Epub 1986/08/15.
68. Hwang, Y. K., Kim, J. H., & Park, M. Dipeptidyl peptidase IV (CD26) expression in normal human epidermis. *Annals of dermatology*, 2014, 26(5), 574-579.
69. Heelan K, Al-Mohammedi F, Smith M, Knowles S, Lansang P, Walsh S. Correlation of the BP180-specific IgG antibody titer with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *JAMA Dermatology*. 2018;154(12):1442-1448. doi:10.1001/jamadermatol.2018.3324

70. Heelan, K., Al-Mohammed, F., Smith, M. J., & Waschke, K. A. Bullous pemphigoid: a review and guide to management. *Drugs*. 2019 79(3), 249-259.
71. Herlihy SE, Brown ML, Pilling D, Weeks BR, Myers LK, Gomer RH. Role of the neutrophil chemorepellent soluble dipeptidyl peptidase IV in decreasing inflammation in a murine model of arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Oct;67(10):2634-8. Epub 2015/07/04.
72. Herlihy SE, Pilling D, Maharjan AS, Gomer RH. Dipeptidyl peptidase IV is a human and murine neutrophil chemorepellent. *J Immunol*. 2013 Jun 15;190(12):6468-77. Epub 2013/05/17.
73. Hertl M, Schuler G. [Bullous autoimmune dermatoses. 1: Classification]. *Hautarzt*. 2002 Mar;53(3):207-19; quiz 20-1. Epub 2002/04/27.
74. Hertl M, Schuler G. [Bullous autoimmune dermatoses. 2: Pathogenesis]. *Hautarzt*. 2002 Apr;53(4):277-85; quiz 85, 87. Epub 2002/06/11.
75. Hertl M, Schuler G. [Bullous autoimmune dermatoses. 3: Diagnosis and therapy]. *Hautarzt*. 2002 May;53(5):352-65; quiz 66-7. Epub 2002/06/18.
76. Hertl M, Zillikens D, Borradori L, Bruckner-Tuderman L, Burckhard H, Eming R, et al. Recommendations for the use of rituximab (anti-CD20 antibody) in the treatment of autoimmune bullous skin diseases. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2008 May;6(5):366-73. Epub 2008/01/19.
77. Hirakawa H, Zempo H, Ogawa M, Watanabe R, Suzuki J, Akazawa H, et al. A DPP-4 inhibitor suppresses fibrosis and inflammation on experimental autoimmune myocarditis in mice. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119360. Epub 2015/03/15.
78. Hiramatsu H, Yamamoto A, Kyono K, Higashiyama Y, Fukushima C, Shima H, et al. The crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) complex with diprotin A. *Biol Chem*. 2004 Jun;385(6):561-4. Epub 2004/07/17.

79. Hofmann, S. C., & Thoma-Uszynski, S. (2015). Bullous pemphigoid: the complement connection. *Immunological investigations*, 44(8), 689-713.
80. Hogan AE, Tobin AM, Ahern T, Corrigan MA, Gaoatswe G, Jackson R, et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and the regulation of human invariant natural killer T cells: lessons from obesity, diabetes and psoriasis. *Diabetologia*. 2011 Nov;54(11):2745-54. Epub 2011/07/12.
81. Hopkinson SB, Jones JC. The N terminus of the transmembrane protein BP180 interacts with the N-terminal domain of BP230, thereby mediating keratin cytoskeleton anchorage to the cell surface at the site of the hemidesmosome. *Mol Biol Cell*. 2000 Jan;11(1):277-86. Epub 2000/01/19.
82. Hopkinson SB, Riddelle KS, Jones JC. Cytoplasmic domain of the 180-kD bullous pemphigoid antigen, a hemidesmosomal component: molecular and cell biologic characterization. *J Invest Dermatol*. 1992 Sep;99(3):264-70. Epub 1992/09/01.
83. Imai H, Fujita T, Kajiya M, Ouhara K, Miyagawa T, Matsuda S, et al. Amphotericin B down-regulates *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced production of IL-8 and IL-6 in human gingival epithelial cells. *Cell Immunol*. 2014 Aug;290(2):201-8. Epub 2014/07/30.
84. Ishii N, Hamada T, Dainichi T, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, et al. Epidermolysis bullosa acquisita: what's new? *J Dermatol*. 2010 Mar;37(3):220-30. Epub 2010/05/29.
85. Izumi K, Nishie W, Mai Y, Wada M, Natsuga K, Ujiie H, et al. Autoantibody Profile Differentiates between Inflammatory and Noninflammatory Bullous Pemphigoid. *J Invest Dermatol*. 2016 Nov;136(11):2201-10. Epub 2016/10/25.
86. Joly P, Roujeau JC, Benichou J, et al. A comparison of oral and topical corticosteroids in patients with bullous pemphigoid. *N Engl J Med*. 2002;346(5):321-327.

87. Joly P, Baricault S, Sparsa A, Bernard P, Bedane C, Duvert-Lehembre S, et al. Incidence and mortality of bullous pemphigoid in France. *J Invest Dermatol*. 2012 Aug;132(8):1998-2004. Epub 2012/03/16.
88. Joly P, Benichou J, Lok C, Hellot MF, Saiag P, Tancrede-Bohin E, et al. Prediction of survival for patients with bullous pemphigoid: a prospective study. *Arch Dermatol*. 2005 Jun;141(6):691-8. Epub 2005/06/22.
89. Joly P, Roujeau JC, Benichou J, Delaporte E, D'Incan M, Dreno B, et al. A comparison of two regimens of topical corticosteroids in the treatment of patients with bullous pemphigoid: a multicenter randomized study. *J Invest Dermatol*. 2009 Jul;129(7):1681-7. Epub 2009/01/30.
90. Jordon RE, Kawana S, Fritz KA. Immunopathologic mechanisms in pemphigus and bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol*. 1985 Jul;85(1 Suppl):72s-8s. Epub 1985/07/01.
91. Jung M, Kippes W, Messer G, Zillikens D, Rzany B. Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence. *J Am Acad Dermatol*. 1999 Aug;41(2 Pt 1):266-8. Epub 1999/07/30.
92. Kamori M, Hagihara M, Nagatsu T, Iwata H, Miura T. Activities of dipeptidyl peptidase II, dipeptidyl peptidase IV, prolyl endopeptidase, and collagenase-like peptidase in synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biochem Med Metab Biol*. 1991 Apr;45(2):154-60. Epub 1991/04/01.
93. Kanasaki K, Shi S, Kanasaki M, He J, Nagai T, Nakamura Y, et al. Linagliptin-mediated DPP-4 inhibition ameliorates kidney fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition in a therapeutic regimen. *Diabetes*. 2014 Jun;63(6):2120-31. Epub 2014/02/28.
94. Kania DS, Gonzalvo JD, Weber ZA. Saxagliptin: a clinical review in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther*. 2011 Aug;33(8):1005-22. Epub 2011/08/02.

95. Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, Amagai M. Pemphigus. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Feb 9;3:17026. doi: 10.1038/nrdp.2017.26. PMID: 28181523.
96. Kasperkiewicz, M., & Zillikens, D. (2017). The pathophysiology of bullous pemphigoid. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 53(1), 23-33.
97. Kasperkiewicz M, Zillikens D. The pathophysiology of bullous pemphigoid. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2007 Oct;33(1-2):67-77. Epub 2007/12/21.
98. Kasprick A, Yu X, Scholten J, et al. Conditional depletion of mast cells has no impact on the severity of experimental epidermolysis bullosa acquisita. *Eur J Immunol*. 2014;44(6):1713-1720. doi:10.1002/eji.201344433.
99. Kidd S, Bueso-Ramos C, Jagan S, Paganessi LA, Boggio LN, Fung HC, et al. In vivo expansion of the megakaryocyte progenitor cell population in adult CD26-deficient mice. *Exp Hematol*. 2011 May;39(5):580-90 e1. Epub 2011/02/05.
100. Kim, J. Y., Kim, J. H., & Cho, D. H. (2019). Dipeptidyl peptidase IV as a potential therapeutic target for psoriasis. *Archives of dermatological research*, 2019, 311 (2), 107-113
101. Kim SC, Schneeweiss S, Glynn RJ, Doherty M, Goldfine AB, Solomon DH. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes may reduce the risk of autoimmune diseases: a population-based cohort study. *Ann Rheum Dis*. 2015 Nov;74(11):1968-75. Epub 2014/06/13.
102. Kirtschig G, Middleton P, Bennett C, Murrell DF, Wojnarowska F, Khumalo NP. Interventions for bullous pemphigoid. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Oct 6(10):CD002292. Epub 2010/10/12.
103. Kiss M, Husz S, Janossy T, Marczinovits I, Molnar J, Korom I, et al. Experimental bullous pemphigoid generated in mice with an antigenic epitope of the human

- hemidesmosomal protein BP230. *J Autoimmun.* 2005 Feb;24(1):1-10. Epub 2005/02/24.
104. Kitada M, Kume S, Takeda-Watanabe A, Tsuda S, Kanasaki K, Koya D. Calorie restriction in overweight males ameliorates obesity-related metabolic alterations and cellular adaptations through anti-aging effects, possibly including AMPK and SIRT1 activation. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Oct;1830(10):4820-7. Epub 2013/06/27.
105. Kneisel A, Hertl M. Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: diagnosis and therapy. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG.* 2011;9(10):927-947; quiz 948. doi:10.1111/j.1610-0387.2011.07799.x
106. Kridin, K Rising incidence of bullous pemphigoid: overview of the literature and suggestions for management. *American Journal of Clinical Dermatology.* 2018, 19(2), 181-190.
107. Kridin K., Ludwig RJ. The Growing Incidence of Bullous Pemphigoid: Overview and Potential Explanations. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:220. Published 2018 Aug 7. doi:10.3389/fmed.2018.00220.
108. Kridin K, Zelber-Sagi S, Khamaisi M, Cohen AD. The diagnostic value of BP230 antibodies in bullous pemphigoid: A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol.* 2018 Jul;79(1):27-33.e3. doi: 10.1016/j.jaad.2018.02.059. Epub 2018 Mar 5. PMID: 29518369.
109. Kridin K. Bullous Pemphigoid: A Comprehensive Review for Clinicians. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology.* 2020;59(1):92-105. doi:10.1007/s12016-020-08794-9.
110. Korman N. Bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol.* 1987 May;16(5 Pt 1):907-24. Epub 1987/05/01.

111. Kornelius E, Lin CL, Chang HH, Li HH, Huang WN, Yang YS, et al. DPP-4 Inhibitor Linagliptin Attenuates Abeta-induced Cytotoxicity through Activation of AMPK in Neuronal Cells. *CNS Neurosci Ther*. 2015 Jul;21(7):549-57. Epub 2015/05/27.
112. Kroller-Schon S, Knorr M, Hausding M, Oelze M, Schuff A, Schell R, et al. Glucose-independent improvement of vascular dysfunction in experimental sepsis by dipeptidyl-peptidase 4 inhibition. *Cardiovasc Res*. 2012 Oct 1;96(1):140-9. Epub 2012/07/31.
113. Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, Mutasim DF, Diaz LA. Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. *J Immunol*. 1986 Feb 15;136(4):1231-5. Epub 1986/02/15.
114. Lamberts A, Euverman HI, Terra JB, Jonkman MF, Horváth B. Quality of Life in Patients With Bullous Pemphigoid and Pemphigus Vulgaris: A Systematic Review. *Acta Derm Venereol*. 2016 Apr;96(4):448-55. doi: 10.2340/00015555-2301. PMID: 26708367.
115. Lamberts, A., Euverman, H. I., Terra, J. B., Jonkman, M.F., & Horvath, B. Quality of life in patients with bullous pemphigoid and its association with disease severity, itch, and use of immunosuppressive medication. *Academy of Dermatology*. 2017, 77(1), 128-134.
116. Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJP, West J, Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris – incidence and mortality in the UK: population-based cohort study. *BMJ* 2008;337:a 180.
117. Langan SM, Groves RW, West J. The relationship between neurological disease and bullous pemphigoid: a population-based case-control study. *J Invest Dermatol*. 2011 Mar;131(3):631-6. Epub 2010/11/19.
118. Layton AM, Cunliffe WJ. Clearing of epidermolysis bullosa acquisita with cyclosporine. *J Am Acad Dermatol*. 1990 Mar;22(3):535-6. Epub 1990/03/01.

- 119.Lee SG, Lee HJ, Yoon MS, Kim DH. Association of Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor Use With Risk of Bullous Pemphigoid in Patients With Diabetes. *JAMA Dermatol.* 2019 Feb 1;155(2):172-7. Epub 2019/01/10.
- 120.Lever WF. Pemphigus. *Medicine (Baltimore).* 1953 Feb;32(1):1-123. Epub 1953/02/01.
- 121.Li Y, Li W, Zhang Y, et al. Mast cells are involved in the pathogenesis of bullous pemphigoid by producing IL-17. *Int Immunopharmacol.* 2018;62:227-233. doi:10.1016/j.intimp.2018.06.015.
- 122.Lindgren O, Varpuluoma O, Tuusa J, Ilonen J, Huilaja L, Kokkonen N, et al. Gliptin-associated Bullous Pemphigoid and the Expression of Dipeptidyl Peptidase-4/CD26 in Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venereol.* 2019 May 1;99(6):602-9. Epub 2019/03/09.
- 123.Lindgren O, Varpuluoma O, Tuusa J, Ilonen J, Huilaja L, Kokkonen N, et al. Gliptin-associated Bullous Pemphigoid and the Expression of Dipeptidyl Peptidase-4/CD26 in Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venereol.* 2019 May 1;99(6):602-9. Epub 2019/03/09.
- 124.List JF, He H, Habener JF. Glucagon-like peptide-1 receptor and proglucagon expression in mouse skin. *Regul Pept.* 2006 May 15;134(2-3):149-57. Epub 2006/04/25.
- 125.Liu X, Li B, Wang W, Zhang C, Zhang M, Zhang Y, et al. Effects of HMG-CoA reductase inhibitor on experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2012 Apr;26(2):121-30. Epub 2012/03/03.
- 126.Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, et al. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest.* 1993 Nov;92(5):2480-8. Epub 1993/11/01.
- 127.Liu Z, Giudice GJ, Swartz SJ, et al. The role of mast cells in autoantibody-induced skin blistering. *J Clin Invest.* 1994;94(4):1739-1744. doi:10.1172/JCI117519.

- 128.Liu Z, Giudice GJ, Swartz SJ, Fairley JA, Till GO, Troy JL, et al. The role of complement in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest.* 1995 Apr;95(4):1539-44. Epub 1995/04/01.
- 129.Liu Z, Giudice GJ, Zhou X, Swartz SJ, Troy JL, Fairley JA, et al. A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest.* 1997 Sep 1;100(5):1256-63. Epub 1997/09/01.
- 130.Liu Z, Shipley JM, Vu TH, Zhou X, Diaz LA, Werb Z, et al. Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid. *J Exp Med.* 1998 Aug 3;188(3):475-82. Epub 1998/08/04.
- 131.Liu Z, Zhou X, Shapiro SD, Shipley JM, Twining SS, Diaz LA, et al. The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. *Cell.* 2000 Sep 1;102(5):647-55. Epub 2000/09/28.
- 132.Lo Schiavo A, Ruocco E, Brancaccio G, Caccavale S, Ruocco V, Wolf R. Bullous pemphigoid: etiology, pathogenesis, and inducing factors: facts and controversies. *Clin Dermatol.* 2013 Jul-Aug;31(4):391-9. Epub 2013/06/29.
- 133.Long M, Cai L, Li W, Zhang L, Guo S, Zhang R, et al. DPP-4 Inhibitors Improve Diabetic Wound Healing via Direct and Indirect Promotion of Epithelial-Mesenchymal Transition and Reduction of Scarring. *Diabetes.* 2018 Mar;67(3):518-31. Epub 2017/12/20.
- 134.Lopez JI, Schiavo-Lena M, Corominas-Cishek A, Yague A, Bauleth K, Guarch R, et al. Nephrogenic adenoma of the urinary tract: clinical, histological, and immunohistochemical characteristics. *Virchows Arch.* 2013 Dec;463(6):819-25. Epub 2013/10/22.
- 135.Lu HI, Chung SY, Chen YL, Huang TH, Zhen YY, Liu CF, et al. Exendin-4 therapy still offered an additional benefit on reducing transverse aortic constriction-induced

- cardiac hypertrophy-caused myocardial damage in DPP-4 deficient rats. *Am J Transl Res.* 2016;8(2):778-98. Epub 2016/05/10.
136. Lu HY, Huang CY, Shih CM, Chang WH, Tsai CS, Lin FY, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor decreases abdominal aortic aneurysm formation through GLP-1-dependent monocytic activity in mice. *PLoS One.* 2015;10(4):e0121077. Epub 2015/04/16.
137. Ludwig RJ, Recke A, Bieber K, et al. [Consensus statement on the use of rituximab in patients with autoimmune bullous dermatoses]. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2012 Nov;10(11):e1-e14. doi: 10.1111/j.1610-0387.2012.07953.x. PMID: 23083005.
138. Mai Y, Nishie W, Sato K, Hotta M, Izumi K, Ito K, et al. Bullous Pemphigoid Triggered by Thermal Burn Under Medication With a Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitor: A Case Report and Review of the Literature. *Front Immunol.* 2018;9:542. Epub 2018/05/01.
139. Makdissi A, Ghanim H, Vora M, Green K, Abuaysheh S, Chaudhuri A, et al. Sitagliptin exerts an antiinflammatory action. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Sep;97(9):3333-41. Epub 2012/06/30.
140. Marguet D, Baggio L, Kobayashi T, Bernard AM, Pierres M, Nielsen PF, et al. Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 6;97(12):6874-9. Epub 2000/05/24.
141. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2004 Oct;4(10):787-99. Epub 2004/10/02.
142. Mas-Vidal A, Santos-Juanes J, Esteve-Martinez A, Caminal-Montero L, Coto-Segura P. Psoriasiform eruption triggered by a dipeptidyl peptidase IV inhibitor. *Australas J Dermatol.* 2012 Feb;53(1):70-2. Epub 2012/02/09.
143. Masunaga T, Shimizu H, Yee C, Borradori L, Lazarova Z, Nishikawa T, et al. The extracellular domain of BPAG2 localizes to anchoring filaments and its carboxyl terminus extends to the lamina densa of normal human epidermal basement membrane. *J Invest Dermatol.* 1997 Aug;109(2):200-6. Epub 1997/08/01.

144. Mathias RA, Simpson RJ. Towards understanding epithelial-mesenchymal transition: a proteomics perspective. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Sep;1794(9):1325-31. Epub 2009/05/15.
145. McMillan JR, Matsumura T, Hashimoto T, Schumann H, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H. Immunomapping of EBA sera to multiple epitopes on collagen VII: further evidence that anchoring fibrils originate and terminate in the lamina densa. *Exp Dermatol*. 2003 Jun;12(3):261-7. Epub 2003/06/26.
146. Megahed M, Scharffetter-Kochanek K. Epidermolysis bullosa acquisita--successful treatment with colchicine. *Arch Dermatol Res*. 1994;286(1):35-46. Epub 1994/01/01.
147. Mendonca FM, Martin-Gutierrez FJ, Rios-Martin JJ, Camacho-Martinez F. Three Cases of Bullous Pemphigoid Associated with Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors - One due to Linagliptin. *Dermatology*. 2016;232(2):249-53. Epub 2016/01/29.
148. Merle C, Blanc D, Zultak M, van Landuyt H, Drobacheff C, Laurent R. Intractable epidermolysis bullosa acquisita: efficacy of cyclosporin A. *Dermatologica*. 1990;181(1):44-7. Epub 1990/01/01.
149. Miyamoto D, Santi CG, Aoki V, Maruta CW. Bullous pemphigoid. *An Bras Dermatol*. 2019 Mar-Apr;94(2):133-46. Epub 2019/05/16.
150. Mohr C, Sunderkotter C, Hildebrand A, Biel K, Rutter A, Rutter GH, et al. Successful treatment of epidermolysis bullosa acquisita using intravenous immunoglobulins. *Br J Dermatol*. 1995 May;132(5):824-6. Epub 1995/05/01.
151. Mooney E, Falk RJ, Gammon WR. Studies on complement deposits in epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol*. 1992 Jan;128(1):58-60. Epub 1992/01/01.
152. Moraes RM, Lima GM, Oliveira FE, Brito AC, Pereira RC, Oliveira LD, et al. Exenatide and Sitagliptin Decrease Interleukin 1beta, Matrix Metalloproteinase 9, and

- Nitric Oxide Synthase 2 Gene Expression But Does Not Reduce Alveolar Bone Loss in Rats With Periodontitis. *J Periodontol*. 2015 Nov;86(11):1287-95. Epub 2015/07/25.
153. Morel P, Guillaume JC. [Treatment of bullous pemphigoid with prednisolone only: 0.75 mg/kg/day versus 1.25 mg/kg/day. A multicenter randomized study]. *Ann Dermatol Venereol*. 1984;111(10):925-8. Epub 1984/01/01.
154. Murrell DF, Daniel BS, Joly P, Borradori L, Amagai M, Hashimoto T, et al. Definitions and outcome measures for bullous pemphigoid: recommendations by an international panel of experts. *J Am Acad Dermatol*. 2019;80(4):930-938.e36.
155. Mutasim DF. Management of autoimmune bullous diseases: pharmacology and therapeutics. *J Am Acad Dermatol*. 2004 Dec;51(6):859-77; quiz 78-80. Epub 2004/12/08.
156. Nader MA. Inhibition of airway inflammation and remodeling by sitagliptin in murine chronic asthma. *Int Immunopharmacol*. 2015 Dec;29(2):761-9. Epub 2015/09/13.
157. Nader MA, El-Awady MS, Shalaby AA, El-Agamy DS. Sitagliptin exerts anti-inflammatory and anti-allergic effects in ovalbumin-induced murine model of allergic airway disease. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2012 Sep;385(9):909-19. Epub 2012/06/27.
158. Nakatani C, Muramatsu T, Shirai T. Immunoreactivity of bullous pemphigoid (BP) autoantibodies against the NC16A and C-terminal domains of the 180 kDa BP antigen (BP180): immunoblot analysis and enzyme-linked immunosorbent assay using BP180 recombinant proteins. *Br J Dermatol*. 1998 Sep;139(3):365-70. Epub 1998/10/10.
159. Nieboer C, Boorsma DM, Woerdeman MJ, Kalsbeek GL. Epidermolysis bullosa acquisita. Immunofluorescence, electron microscopic and immunoelectron microscopic studies in four patients. *Br J Dermatol*. 1980 Apr;102(4):383-92. Epub 1980/04/01.

160. Nishie W, Lamer S, Schlosser A, Licarete E, Franzke CW, Hofmann SC, et al. Ectodomain shedding generates Neoepitopes on collagen XVII, the major autoantigen for bullous pemphigoid. *J Immunol*. 2010 Oct 15;185(8):4938-47. Epub 2010/09/24.
161. Nonaka S, Ishiko A, Masunaga T, Akiyama M, Owaribe K, Shimizu H, et al. The extracellular domain of BPAG2 has a loop structure in the carboxy terminal flexible tail in vivo. *J Invest Dermatol*. 2000 Nov;115(5):889-92. Epub 2000/11/09.
162. Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C. Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends Immunol*. 2008 Jun;29(6):295-301. Epub 2008/05/06.
163. Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C. Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends Immunol*. 2008 Jun;29(6):295-301. Epub 2008/05/06.
164. Okauchi Y, Tomoda Y, Takata M, Deguchi A, Takata M, Takenoshita Y, et al. Pemphigus vulgaris developing after 6-month treatment with a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor: A case report. *J Dermatol*. 2018 Feb;45(2):e39-e40. Epub 2017/10/04.
165. O'Reilly N, Hügler T, Keohane C, et al. Mast cell numbers and their activity are increased in non-lesional skin of patients with bullous pemphigoid. *Acta Derm Venereol*. 2007;87(1):29-33. doi:10.2340/00015555-0175.
166. Parker SR, Dyson S, Brisman S, Pennie M, Swerlick RA, Khan R, et al. Mortality of bullous pemphigoid: an evaluation of 223 patients and comparison with the mortality in the general population in the United States. *J Am Acad Dermatol*. 2008 Oct;59(4):582-8. Epub 2008/08/19.
167. Pasmuzzi E, Monastirli A, Habeos J, Georgiou S, Tsambaos D. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors cause bullous pemphigoid in diabetic patients: report of two cases. *Diabetes Care*. 2011 Aug;34(8):e133. Epub 2011/07/27.

- 168.Patsatsi A, Kyriakou A, Werth VP. Bullous pemphigoid in adolescence. *Pediatr Dermatol.* 2019 Mar;36(2):184-8. Epub 2018/12/21.
- 169.Plaquevent M, Tetart F, Fardet L, Ingen-Housz-Oro S, Valeyrie-Allanore L, Bernard P, et al. Higher Frequency of Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Intake in Bullous Pemphigoid Patients than in the French General Population. *J Invest Dermatol.* 2019 Apr;139(4):835-41. Epub 2018/12/14.
- 170.Rahfeld J, Schierhorn M, Hartrodt B, Neubert K, Heins J. Are diprotin A (Ile-Pro-Ile) and diprotin B (Val-Pro-Leu) inhibitors or substrates of dipeptidyl peptidase IV? *Biochim Biophys Acta.* 1991 Jan 29;1076(2):314-6. Epub 1991/01/29.
- 171.Reinhold D, Bank U, Buhling F, Lendeckel U, Faust J, Neubert K, et al. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor-beta 1 in PWM-stimulated PBMC and T cells. *Immunology.* 1997 Jul;91(3):354-60. Epub 1997/07/01.
- 172.Remington J, Chen M, Burnett J, Woodley DT. Autoimmunity to type VII collagen: epidermolysis bullosa acquisita. *Curr Dir Autoimmun.* 2008;10:195-205. Epub 2008/05/08.
- 173.Roussel A, Benichou J, Randriamanantany ZA, Gilbert D, Drenovska K, Houivet E, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the combination of bullous pemphigoid antigens 1 and 2 in the diagnosis of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol.* 2011 Mar;147(3):293-8. Epub 2011/03/23.
- 174.Ruhrberg C, Watt FM. The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture. *Curr Opin Genet Dev.* 1997 Jun;7(3):392-7. Epub 1997/06/01.
- 175.Rzany B, Partscht K, Jung M, Kippes W, Mecking D, Baima B, et al. Risk factors for lethal outcome in patients with bullous pemphigoid: low serum albumin level, high dosage of glucocorticosteroids, and old age. *Arch Dermatol.* 2002 Jul;138(7):903-8. Epub 2002/06/20.

176. Sadler E, Schafleitner B, Lanschuetzer C, Laimer M, Pohla-Gubo G, Hametner R, et al. Treatment-resistant classical epidermolysis bullosa acquisita responding to rituximab. *Br J Dermatol*. 2007 Aug;157(2):417-9. Epub 2007/06/29.
177. Saito T, Ohnuma K, Suzuki H, Dang NH, Hatano R, Ninomiya H, et al. Polyarthropathy in type 2 diabetes patients treated with DPP4 inhibitors. *Diabetes Res Clin Pract*. 2013 Oct;102(1):e8-e12. Epub 2013/08/14.
178. Sakai LY, Keene DR, Morris NP, Burgeson RE. Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J Cell Biol*. 1986 Oct;103(4):1577-86. Epub 1986/10/01.
179. Salemme A, Fania L, Scarabello A, Caproni M, Valerio A, et al. Gliptin-associated bullous pemphigoid shows peculiar features of anti-BP180 and -BP230 humoral response: Results of a multicenter study. *J Am Acad Dermatol*. 2022 Jul;87(1):56-63. Epub 2022 Mar 1.
180. Schaapveld RQ, Borradori L, Geerts D, van Leusden MR, Kuikman I, Nievers MG, et al. Hemidesmosome formation is initiated by the beta4 integrin subunit, requires complex formation of beta4 and HD1/plectin, and involves a direct interaction between beta4 and the bullous pemphigoid antigen 180. *J Cell Biol*. 1998 Jul 13;142(1):271-84. Epub 1998/07/14.
181. Schmidt E. [Optimizing therapy in patients with severe autoimmune blistering skin diseases]. *Hautarzt*. 2009 Aug;60(8):633-40. Epub 2009/06/19.
- ~~182. Schmidt E, Bastian B, Dummer R, Tony HP, Brocker EB, Zillikens D. Detection of elevated levels of IL-4, IL-6, and IL-10 in blister fluid of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res*. 1996 Jun;288(7):353-7. Epub 1996/06/01.~~
183. Schmidt E, Benoit S, Brocker EB, Zillikens D, Goebeler M. Successful adjuvant treatment of recalcitrant epidermolysis bullosa acquisita with anti-CD20 antibody rituximab. *Arch Dermatol*. 2006 Feb;142(2):147-50. Epub 2006/02/24.

184. Schmidt E, della Torre R, Borradori L. Clinical features and practical diagnosis of bullous pemphigoid. *Dermatol Clin*. 2011 Jul;29(3):427-38, viii-ix. Epub 2011/05/25.
185. Schmidt E, Zillikens D. The diagnosis and treatment of autoimmune blistering skin diseases. *Dtsch Arztebl Int*. 2011 Jun;108(23):399-405, I-III. Epub 2011/06/30.
186. Schmidt E, Zillikens D. Pemphigoid diseases. *Lancet*. 2013 Jan 26;381(9863):320-32. Epub 2012/12/15.
187. Schmidt et al. Bullous pemphigoid: a comprehensive review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*
188. Schmidt E, Kasperkiewicz M, Joly P. Pemphigoid diseases: Pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Autoimmun Rev*. 2016;15(8):825-855.
189. Schulze F, Kasperkiewicz M, Zillikens D, Schmidt E. [Bullous pemphigoid]. *Hautarzt*. 2013 Dec;64(12):931-43; quiz 44-5. Epub 2013/12/18.
190. Schurmann C, Linke A, Engelmann-Pilger K, Steinmetz C, Mark M, Pfeilschifter J, et al. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin attenuates inflammation and accelerates epithelialization in wounds of diabetic ob/ob mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012 Jul;342(1):71-80. Epub 2012/04/12.
191. Segura S, Iranzo P, Martinez-de Pablo I, Mascaro JM, Jr., Alsina M, Herrero J, et al. High-dose intravenous immunoglobulins for the treatment of autoimmune mucocutaneous blistering diseases: evaluation of its use in 19 cases. *J Am Acad Dermatol*. 2007 Jun;56(6):960-7. Epub 2007/03/21.
192. Seitz O, Schurmann C, Hermes N, Muller E, Pfeilschifter J, Frank S, et al. Wound healing in mice with high-fat diet- or ob gene-induced diabetes-obesity syndromes: a comparative study. *Exp Diabetes Res*. 2010;2010:476969. Epub 2011/02/15.
193. Sitaru C. Experimental models of epidermolysis bullosa acquisita. *J Experimental Dermatology*. 2007 Mar;16(6): 520-531. Epub 2007/03/09.

194. Sitaru C, Goebeler M, Zillikens D. [Bullous autoimmune dermatoses (I): Pathogenesis and diagnosis]. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2004 Feb;2(2):123-8; quiz 39-40. Epub 2005/11/11.
195. Sitaru C, Mihai S, Otto C, Chiriac MT, Hausser I, Dotterweich B, et al. Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *J Clin Invest.* 2005 Apr;115(4):870-8. Epub 2005/04/21.
196. Sitaru C, Schmidt E, Petermann S, Munteanu LS, Brocker EB, Zillikens D. Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *J Invest Dermatol.* 2002 Apr;118(4):664-71. Epub 2002/03/29.
197. Sitaru C, Schmidt E, Petermann S, Munteanu LS, Brocker EB, Zillikens D. Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *J Invest Dermatol.* 2002 Apr;118(4):664-71. Epub 2002/03/29.
198. Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer KM, MacLellan WR, DeMayo FJ, Spinale FG, et al. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation.* 2001 Aug 14;104(7):826-31. Epub 2001/08/15.
199. Skandalis K, Spirova M, Gaitanis G, Tsartsarakis A, Bassukas ID. Drug-induced bullous pemphigoid in diabetes mellitus patients receiving dipeptidyl peptidase-IV inhibitors plus metformin. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012 Feb;26(2):249-53. Epub 2011/04/07.
200. Skaria M, Jaunin F, Hunziker T, Riou S, Schumann H, Bruckner-Tuderman L, et al. IgG autoantibodies from bullous pemphigoid patients recognize multiple antigenic reactive sites located predominantly within the B and C subdomains of the COOH-terminus of BP230. *J Invest Dermatol.* 2000 May;114(5):998-1004. Epub 2000/04/20.

201. Stavropoulos PG, Soura E, Antoniou C. Drug-induced pemphigoid: a review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014 Sep;28(9):1133-40. Epub 2014/01/11.
202. Stulc T, Sedo A. Inhibition of multifunctional dipeptidyl peptidase-IV: is there a risk of oncological and immunological adverse effects? *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 May;88(2):125-31. Epub 2010/03/23.
203. Talbott JH. Serum Urate in Relatives of Gouty Patients. *J Clin Invest*. 1940 Jul;19(4):645-8. Epub 1940/07/01.
204. Tanaka K, Ogawa Y, Shimada S. Drug eruption caused by sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor. *J Dermatol*. 2012 Aug;39(8):726-8. Epub 2011/10/11.
205. Tanaka M, Hashimoto T, Amagai M, Shimizu N, Ikeguchi N, Tsubata T, et al. Characterization of bullous pemphigoid antibodies by use of recombinant bullous pemphigoid antigen proteins. *J Invest Dermatol*. 1991 Oct;97(4):725-8. Epub 1991/10/01.
206. Tanno M, Kuno A, Yano T, Miura T, Hisahara S, Ishikawa S, et al. Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. *J Biol Chem*. 2010 Mar 12;285(11):8375-82. Epub 2010/01/22.
207. Tasanen K, Tunggal L, Chometon G, Bruckner-Tuderman L, Aumailley M. Keratinocytes from patients lacking collagen XVII display a migratory phenotype. *Am J Pathol*. 2004 Jun;164(6):2027-38. Epub 2004/05/27.
208. Tasanen K, Varpuluoma O, Nishie W. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor-Associated Bullous Pemphigoid. *Front Immunol*. 2019;10:1238. Epub 2019/07/06.
209. Thielitz A, Ansorge S, Bank U, Tager M, Wrenger S, Gollnick H, et al. The ectopeptidases dipeptidyl peptidase IV (DP IV) and aminopeptidase N (APN) and their related enzymes as possible targets in the treatment of skin diseases. *Front Biosci*. 2008 Jan 1;13:2364-75. Epub 2007/11/06.

210. Thielitz A, Vetter RW, Schultze B, Wrenger S, Simeoni L, Ansorge S, et al. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV-like activity mediate antifibrotic effects in normal and keloid-derived skin fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 2008 Apr;128(4):855-66. Epub 2007/10/19.
211. Thoma-Uszynski S, Uter W, Schwietzke S, Hofmann SC, Hunziker T, Bernard P, et al. BP230- and BP180-specific auto-antibodies in bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 2004 Jun;122(6):1413-22. Epub 2004/06/04.
212. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003 Oct 15;552(Pt 2):335-44. Epub 2003/10/17.
213. Ujiie H, Muramatsu K, Mushiroda T, Ozeki T, Miyoshi H, Iwata H, et al. HLA-DQB1*03:01 as a Biomarker for Genetic Susceptibility to Bullous Pemphigoid Induced by DPP-4 Inhibitors. *J Invest Dermatol.* 2018 May;138(5):1201-4. Epub 2017/12/06.
214. Vaillant L, Bernard P, Joly P, et al. Evaluation of clinical criteria for diagnosis of bullous pemphigoid. French Bullous Study Group. *Arch Dermatol.* 1998;134(9):1075-1080.
215. van Beek N, Rentzsch K, Probst C, Komorowski L, Kasperkiewicz M, Fechner K, et al. Serological diagnosis of autoimmune bullous skin diseases: prospective comparison of the BIOCHIP mosaic-based indirect immunofluorescence technique with the conventional multi-step single test strategy. *Orphanet J Rare Dis.* 2012 Aug 9;7:49. Epub 2012/08/11.
216. Varpuluoma O, Forsti AK, Jokelainen J, Turpeinen M, Timonen M, Tasanen K, et al. Oral diabetes medications other than dipeptidyl peptidase 4 inhibitors are not associated with bullous pemphigoid: A Finnish nationwide case-control study. *J Am Acad Dermatol.* 2018 Dec;79(6):1034-8 e5. Epub 2018/05/29.
217. Venning VA, Taghipour K, Mohd Mustapa MF, Highet AS, Kirtschig G, Wojnarowska F. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of bullous pemphigoid 2012. *Br J Dermatol.* 2012;167(6):1200-1214.

218. Verraes S, Hornebeck W, Polette M, Borradori L, Bernard P. Respective contribution of neutrophil elastase and matrix metalloproteinase 9 in the degradation of BP180 (type XVII collagen) in human bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 2001 Nov;117(5):1091-6. Epub 2001/11/17.
219. Vodegel RM, Jonkman MF, Pas HH, de Jong MC. U-serrated immunodeposition pattern differentiates type VII collagen targeting bullous diseases from other subepidermal bullous autoimmune diseases. *Br J Dermatol.* 2004 Jul;151(1):112-8. Epub 2004/07/24.
220. Vodegel RM, Jonkman MF, Pas HH, de Jong MC. U-serrated immunodeposition pattern differentiates type VII collagen targeting bullous diseases from other subepidermal bullous autoimmune diseases. *Br J Dermatol.* 2004 Jul;151(1):112-8. Epub 2004/07/24.
221. Waumans Y, Baerts L, Kehoe K, Lambeir AM, De Meester I. The Dipeptidyl Peptidase Family, Prolyl Oligopeptidase, and Prolyl Carboxypeptidase in the Immune System and Inflammatory Disease, Including Atherosclerosis. *Front Immunol.* 2015;6:387. Epub 2015/08/25.
222. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* 1989 Feb 9;320(6):365-76. Epub 1989/02/09.
223. Wenzel SE, Trudeau JB, Barnes S, Zhou X, Cundall M, Westcott JY, et al. TGF-beta and IL-13 synergistically increase eotaxin-1 production in human airway fibroblasts. *J Immunol.* 2002 Oct 15;169(8):4613-9. Epub 2002/10/09.
224. Wetzler C, Kampfner H, Stallmeyer B, Pfeilschifter J, Frank S. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *J Invest Dermatol.* 2000 Aug;115(2):245-53. Epub 2000/08/22.

225. Wieland CN, Comfere NI, Gibson LE, Weaver AL, Krause PK, Murray JA. Anti-bullous pemphigoid 180 and 230 antibodies in a sample of unaffected subjects. *Arch Dermatol*. 2010 Jan;146(1):21-5. Epub 2010/01/20.
226. Wojnarowska F, Kirtschig G, Khumalo N. Treatment of subepidermal immunobullous diseases. *Clin Dermatol*. 2001 Nov-Dec;19(6):768-77. Epub 2001/11/14.
227. Woodley DT, Chang C, Saadat P, Ram R, Liu Z, Chen M. Evidence that anti-type VII collagen antibodies are pathogenic and responsible for the clinical, histological, and immunological features of epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 958-964.
228. Woodley DT, Ram R, Doostan A et al. Induction of epidermolysis bullosa acquisita in mice by passive transfer of autoantibodies from patients. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1323-1330.
229. Woodley DT, Briggaman RA, O'Keefe EJ, Inman AO, Queen LL, Gammon WR. Identification of the skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. *N Engl J Med*. 1984 Apr 19;310(16):1007-13. Epub 1984/04/19.
230. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Sep;49(9):1618-31. Epub 2010/03/27.
231. Wright SW, Ammirati MJ, Andrews KM, Brodeur AM, Danley DE, Doran SD, et al. cis-2,5-dicyanopyrrolidine inhibitors of dipeptidyl peptidase IV: synthesis and in vitro, in vivo, and X-ray crystallographic characterization. *J Med Chem*. 2006 Jun 1;49(11):3068-76. Epub 2006/05/26.
232. Yamagami J, Mimura Y, Ujiie H, et al. Usefulness of the bullous pemphigoid disease area index for guiding the treatment of bullous pemphigoid. *J Dermatol*. 2014;41(9):780-782.

233. Yamagami J, Nakamura M, Ohyama B, et al. Development of a novel outcome measurement tool for bullous pemphigoid disease: bullous pemphigoid skin disorder index. *Arch Dermatol Res.* 2018;310(10):829-835.
234. Yancey KB, Egan CA. The immunopathogenesis of bullous pemphigoid: what we know and what we need to know. *Front Immunol.* 2019;10:940.
235. Yang, L., & Scott, K. A. DPP-IV inhibition attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease,* 2014, 9, 975-984.
236. Yaoita H, Briggaman RA, Lawley TJ, Provost TT, Katz SI. Epidermolysis bullosa acquisita: ultrastructural and immunological studies. *J Invest Dermatol.* 1981 Apr;76(4):288-92. Epub 1981/04/01.
237. Yazbeck R, Howarth GS, Abbott CA. Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? *Trends Pharmacol Sci.* 2009 Nov;30(11):600-7. Epub 2009/10/20.
238. Zarea I, Kerkeni N, Ishak F, et al. Usefulness of the bullous pemphigoid disease area index in routine clinical practice: recommendations for clinical studies and routine care. *Br J Dermatol.* 2018;179(3): 766-767.
239. Zeng Y, Li C, Guan M, Zheng Z, Li J, Xu W, et al. The DPP-4 inhibitor sitagliptin attenuates the progress of atherosclerosis in apolipoprotein-E-knockout mice via AMPK- and MAPK-dependent mechanisms. *Cardiovasc Diabetol.* 2014 Feb 4;13:32. Epub 2014/02/05.
240. Zillikens D, Wever S, Roth A, Weidenthaler-Barth B, Hashimoto T, Bröcker EB. Incidence of autoimmune subepidermal blistering dermatoses in a region of central Germany. *Arch Dermatol.* 1995; 131 (8): 957-958.
241. Zillikens D, Mascaro JM, Rose PA, Liu Z, Ewing SM, Caux F, et al. A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180

autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 1997 Nov;109(5):679-83. Epub 1997/11/05.

242.Zone JJ, Taylor T, Hull C, Schmidt L, Meyer L. IgE basement membrane zone antibodies induce eosinophil infiltration and histological blisters in engrafted human skin on SCID mice. *J Invest Dermatol.* 2007 May;127(5):1167-74. Epub 2007/01/20.

7. Anhang

Schleswig-Holstein
Der echte Norden



Schleswig-Holstein
Ministerium für Energie-
wende, Landwirtschaft,
Umwelt und ländliche Räume

Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt
und ländliche Räume | Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Ihr Antrag vom: 23.03.2015

Herrn
Dr. Christian Sadik
Klinik für Dermatologie, Allergologie
und Venerologie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Mein Zeichen: V 242-7224.122-5 (41-3/15)

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:

Herrn Dr. B. Schmelting
Gemeinsame Tierhaltung
der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

23. April 2015

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrter Herr Dr. Sadik,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch Gesetz vom 28. Juli 2014 (BGBl. I S. 1308), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

Die Rolle der Dipeptidyl Peptidase-IV in der Pathogenese von Pemphigoid-Erkrankungen zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 192 Mäuse verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 30. April 2018 befristet.
3. Ort der Durchführung:
Universität zu Lübeck, Gemeinsame Tierhaltung

Dienstgebäude: Mercatorstraße 3, 5, 7, 24106 Kiel | Adolf-Westphal-Str. 4, 24143 Kiel | Telefon 0431 988-0 | Telefax 0431 988-7239 |
poststelle@melur.landsh.de | www.melur.schleswig-holstein.de | E-Mail-Adressen: Kein Zugang für elektronisch verschlüsselte
Dokumente.

4. Leiter des Versuchsvorhabens:
Herr Dr. Christian Sadik
5. Stellvertreter:
Herr Prof. Dr. Ralf Ludwig
6. Wechselt der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
7. Verantwortlicher Tierarzt nach § 28 der Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125):
Herr Dr. B. Schmelting
8. Weitere Nebenbestimmungen:
Keine.

Die im Antrag gemachten Angaben sind Bestandteil dieser Genehmigung. Sofern vorstehend abweichende Nebenbestimmungen getroffen wurden, gehen diese den Angaben im Antrag vor.

Die Bestimmungen des § 8 des Tierschutzgesetzes, der Tierschutz-Versuchstierverordnung sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVOBl. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten.

Ich weise insbesondere darauf hin, dass Tierversuche nur durch den in § 16 der Tierschutz-Versuchstierverordnung genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Zustellung schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle Klage beim Verwaltungsgericht Schleswig-Holstein in 24837 Schleswig, Brockdorff-Rantzau-Straße 13, erhoben werden.

Mit freundlichen Grüßen


Butcherer

8. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Ich möchte meinen ganz besonderen Dank meinem Betreuer und Doktorvater widmen, denn er hat sich stets Zeit genommen und ein offenes Ohr für Probleme und Anregungen gehabt und diese Arbeit hervorragend betreut. Auch hat er mir stets das Gefühl gegeben, Teil der Arbeitsgruppe zu sein und mich dementsprechend eingebunden, so dass ich mich sehr wohl gefühlt habe. Durch ihn habe ich die systematische Analyse von Problemen und das wissenschaftliche Arbeiten gelernt.

Prof. Dr. D. Z. möchte ich dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gab, meine Dissertation in seiner Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie an der Universität zu Lübeck zu erstellen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Autoimmunitätsgruppe bedanken. Mein besonderer Dank gilt unserem Medizinisch-technischen Assistent, S. M., der mir immer hilfreich zur Seite stand. Persönlich danke ich auch sehr meiner Kollegin und Freundin T. S. für ihre Hilfsbereitschaft besonders während meiner experimentellen Phase im Labor.

Auch gilt den Blutspendern großer Dank, mit deren Hilfe die Durchführung der Experimente ermöglicht wurde.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Mitbewohnerin und Freundin Dr. E-M. L. für Ihre Geduld bedanken. Anschließend gilt mein herzlichster Dank meiner Familie für Ihre seelische Unterstützung und natürlich meinem Mann Prof. Dr. E. L., der mir stets mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite stand. Ihnen widme ich diese Arbeit.

•