

Aus dem Institut  
für Experimentelle Dermatologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Ralf Ludwig

**Assoziation von Serumautoantikörpern mit der Klinik  
und dem Outcome der BLISTER  
(Bullous Pemphigoid Steroids and Tetracyclines)  
Studie**

Inauguraldissertation  
Zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
**- Aus der Sektion Medizin -**

vorgelegt von  
**Maike Marleen Holtsche**  
aus Offenbach am Main

Lübeck 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Enno Schmidt  
2. Berichterstatterin/Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christoph Hölscher  
Tag der mündlichen Prüfung: 9.5.2018  
zum Druck genehmigt. Lübeck, den 9.5.2018  
- Promotionskommission der Sektion Medizin -

*Meinen Eltern gewidmet*

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
1. Einleitung .....	1
1.1 Epidemiologie .....	2
1.2 Zielantigene .....	3
1.3 Pathophysiologie .....	6
1.4 Klinik .....	8
1.5 Diagnostik .....	10
1.6 Therapie .....	13
1.7 Bullous Pemphigoid Steroids and Tetracyclines (BLISTER) Studie .....	15
2. Fragestellung .....	17
3. Material und Methoden .....	18
3.1 Patienten und Design .....	18
3.2 Indirekte Immunfluoreszenz .....	18
3.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	20
3.4 BIOCHIP Mosaik® .....	21
3.5 Immunoblot .....	22
3.6 Statistik .....	27
4. Ergebnisse .....	28
4.1 Indirekte Immunfluoreszenz .....	28
4.2 ELISA .....	30
4.3 BIOCHIP Mosaik® .....	31
4.4 Immunoblot .....	33
4.5 Zusammenfassung der serologischen Ergebnisse .....	36
4.6 Klinische Angaben .....	37
4.7 Korrelationsanalysen .....	40
5. Diskussion .....	45
6. Zusammenfassung .....	57
7. Literaturverzeichnis .....	59
8. Anhang .....	76
8.1 Abkürzungsverzeichnis .....	76
8.2 Materialien .....	78
9. Danksagungen .....	83
10. Lebenslauf .....	84
11. Veröffentlichungen und Kongressbeiträge .....	85

# 1. Einleitung

Das bullöse Pemphigoid (BP) gehört zur Gruppe der blasenbildenden Autoimmundermatosen. Dabei handelt es sich um Autoimmunerkrankungen, bei denen Autoantikörper gegen Strukturproteine der Haut gebildet werden. Walter Lever grenzte erstmals 1953 histopathologisch die Pemphigoid- von den Pemphigus-Erkrankungen innerhalb der Gruppe der blasenbildenden Autoimmundermatosen ab, welche im Gegensatz zur intraepidermalen Spaltbildung beim Pemphigus eine subepidermale Spaltbildung aufweisen (104). Vierzehn Jahre später konnten Jordan et al. erstmalig Autoantikörper gegen Strukturproteine der dermo-epidermalen Junktionszone im Serum und der Haut von BP Patienten nachweisen (87). Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Pemphigoid-Erkrankungen und deren Zielantigene.

**Tabelle 1: Pemphigoid-Erkrankungen**

Erkrankung	DIF	IIF auf Spalhhaut	Zielantigene
Bullöses Pemphigoid	C3>IgG>IgA	IgG>IgA epidermal	<b>BP180 NC16A</b> , BP230
Schleimhaut-pemphigoid	IgG>C3; IgA	IgG und IgA epidermal, IgG dermal	<b>BP180, Laminin 332</b> , BP230, $\alpha6\beta4$ -Integrin, Laminin 331, Typ VII Kollagen
Pemphigoid gestationis	C3>IgG	Komplement fixierendes IgG epidermal	<b>BP180 NC16A</b> , BP230
Lineare IgA-Dermatose	IgA>C3>IgG	IgA>IgG epidermal	<b>BP180</b> , vor allem proteolytisches Spaltprodukt von BP180 (LAD-1)
Epidermolysis bullosa acquisita	IgG	IgG dermal	<b>Typ VII Kollagen</b>
Anti-p200/Laminin $\gamma1$ Pemphigoid	C3, IgG	IgG dermal	<b>Laminin <math>\gamma1</math>/p200 Antigen</b>
Lichen planus pemphigoides	C3, IgG	IgG epidermal	<b>BP180 NC16A</b> , BP230

DIF: direkte Immunfluoreszenz; IIF: indirekte Immunfluoreszenz; LAD-1: Lineare-IgA-Dermatose Antigen 1. Hauptantigene der jeweiligen Erkrankungen sind fett hervorgehoben. Tabelle modifiziert nach Zillikens 2012 (182).

## 1.1 Epidemiologie

Das BP ist die häufigste blasenbildende Autoimmundermatose. Die Angaben zur Inzidenz bewegen sich in den verschiedenen Ländern zwischen 2,4 und 66 Neuerkrankungen pro 1 Mio. Einwohner pro Jahr (5, 8, 10, 30, 32, 68, 86, 98, 110, 120, 149, 170, 177). In Deutschland wird die Inzidenz mit 13,4 Neuerkrankungen/1 Mio. Einwohner/Jahr angegeben (10). Die Inzidenz des BP ist in den letzten 10 Jahren stark angestiegen und hat sich mindestens verdoppelt (10, 86). Mögliche Gründe für die steigende Inzidenz sind die zunehmende Alterung der Bevölkerung, die bessere Diagnostik der Erkrankung sowie die Zunahme der Risikofaktoren wie neurologische Erkrankungen und Medikamenteneinnahme (zum Beispiel Diuretika, Antiepileptika) (86). Die Prävalenz in Deutschland wurde kürzlich von Hübner et al. mit 259,3/Mio. angegeben (77). Betroffen sind hauptsächlich ältere Patienten über 75 Jahre. Bei Patienten über 80 Jahre steigt die Inzidenz stark an (189/1 Mio. Einwohner/Jahr) (10). Bei den betroffenen Patienten ist die Mortalität im Gegensatz zur restlichen Bevölkerung erhöht. Die Angaben zur Mortalität im ersten Jahr bewegen sich zwischen 11% und 41% (28, 31, 86, 98, 131), in Deutschland wird sie mit 29% (135) angegeben. Ein niedriger Karnofsky Score, welcher die Einschränkung der Aktivität und Selbstversorgung angibt (84), und hohes Alter haben sich in prospektiven Studien als Prädiktor für eine erhöhte Mortalität herausgestellt (135). In Deutschland wurde die tägliche Einnahme von mehr als 37 mg Prednisolon mit einer erhöhten Mortalität in Verbindung gebracht (135).

In den letzten Jahren konnte nachgewiesen werden, dass das BP mit neurologischen Erkrankungen wie Demenz, Morbus Parkinson, Apoplex, Epilepsie und multipler Sklerose assoziiert ist (6, 29, 54, 82, 97, 157). In wieweit die Expression der beiden Hauptantigene des BP, BP180 und BP230, im zentralen Nervensystem mit der Entwicklung der neurologischen Erkrankungen in Verbindung steht, wird aktuell untersucht (56, 114, 129). Zudem konnte eine Assoziation von hämatologischen Malignomen mit BP gezeigt werden (147). Zum genetischen Hintergrund beim BP gibt es bisher nur wenige Daten. So konnte unter anderem eine Assoziation mit dem Vorliegen eines BPs und HLA-DQB1\*0301 nachgewiesen werden (38).

## 1.2 Zielantigene

Ursächlich für die prallen Blasen des BP sind Autoantikörper gegen hemidesmosomale Strukturproteine der Haut. Hemidesmosomen dienen der Verbindung der basalen Keratinozyten der Epidermis mit der darunterliegenden Dermis. Die beiden Hauptzielantigene des BP sind BP180 und BP230 (142).

BP180, auch Kollagen Typ XVII oder BP Antigen 2 genannt, ist ein 180 kDa schweres transmembranöses Glykoprotein. Die zytoplasmatische Domäne, bestehend aus einem N-Terminus, interagiert mit BP230, Plektin und Integrin  $\beta 4$  (64, 76). Der extrazelluläre C-Terminus besteht aus 15 kollagenösen und 16 nicht-kollagenösen Domänen, welche sich abwechseln (61). Der extrazelluläre Anteil interagiert mit Laminin 332 und Integrin  $\alpha 6$  (75). Als immunodominant beim BP stellte sich seine 16. nicht kollagenöse Domäne (NC16A) heraus (179). 75-90% der BP Patienten weisen Antikörper gegen diese Domäne auf (62, 93, 112, 136, 155, 161, 179). Die Höhe der Antikörperspiegel korreliert mit der Krankheitsaktivität (137). Dagegen sind Antikörper gegen C-terminale Epitope mit einer Schleimhautbeteiligung assoziiert (72). Die vorherrschenden IgG Subklassen sind IgG1 und IgG4 (43). Neben IgG Antikörpern weisen Patienten auch IgA und IgE Antikörper gegen NC16A auf (27, 43, 81, 95, 113, 165, 166). Der Anteil der BP Patienten mit zusätzlichen IgE Antikörpern gegen NC16A wurde in verschiedenen Studien mit 100%, 55%, 22%, 77%, 30%, 61%, 71%, 39% und 42% angegeben (27, 43, 44, 79, 81, 105, 113, 127, 166). IgE-Ablagerungen in der Haut wurde dagegen nur in 25% und 41% der Patienten mittels direkter Immunfluoreszenz (DIF) nachgewiesen (128, 172). Die in 50-60% der BP Patienten festgestellte periphere Eosinophilie und das in 70-85% erhöhte Gesamt IgE (165) stehen im Einklang mit dem Beleg der Pathogenität der Anti-BP180 IgE Antikörper in vitro und in zwei Mausmodellen (49, 115, 183). Zudem konnten in der periläsionalen Haut eines BP Patienten IgE präsentierende Mastzellen detektiert werden (45). Des Weiteren wurden bereits einzelne BP Patienten erfolgreich mit dem Anti-IgE-Antikörper Omalizumab behandelt (50, 108, 174). Das Vorhandensein von IgE Antikörpern gegen BP180 NC16A wurde mit einer schwereren Form der Erkrankung, längerer Remissionszeit und der Notwendigkeit einer aggressiveren Therapie assoziiert (81).

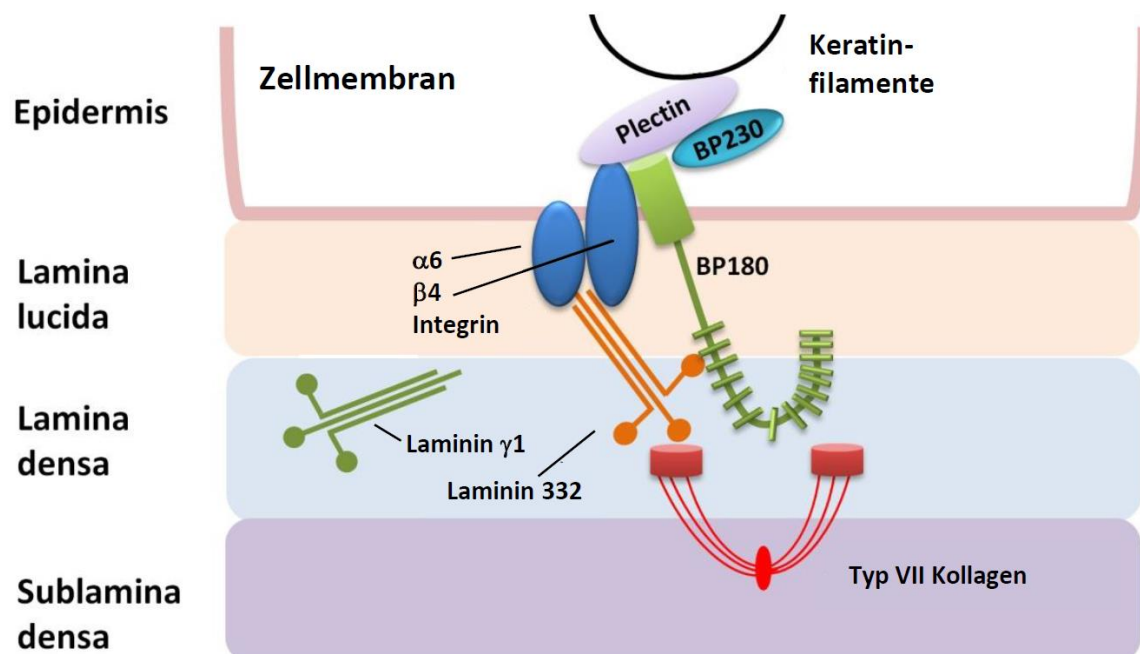
Zudem berichteten Delaporte et al. und Kalowska et al., dass die Anti-BP180 IgE Spiegel sinken, wenn Patienten in Remission kommen (37, 89). Die Anti-BP180 IgE Spiegel korrelieren zudem intraindividuell im Krankheitsverlauf mit der Krankheitsaktivität, eine Assoziation der Anti-BP180 IgE Spiegel speziell mit den urtikariellen oder erythematösen Läsionen konnte nicht nachgewiesen werden (166). Im Gegensatz hierzu zeigte sich in der gleichen Studie allerdings ein Zusammenhang der urtikariellen oder erythematösen Läsionen mit den Gesamt IgE Werten der BP Patienten, ebenso korrelierten die Gesamt IgE Werte mit der Intensität des Juckreizes (166). Eine weitere Studie zeigte eine positive Korrelation der Gesamt IgE Spiegel mit der Höhe der Anti-Basalmembran-Antikörper der BP Patienten (4).

Mittels Proteasen lässt sich die 120 kDa schwere lösliche Ektodomäne von BP180 abspalten. Dieses wird dann als lineare IgA Dermatose Antigen-1 (LAD-1) bezeichnet und findet sich neben dem BP auch bei der linearen IgA-Dermatose (111).

Das 230 kDa schwere BP230 ist ein intrazelluläres Protein der hemidesmosomalen Plaques und gehört zur Plakin-Familie (133). Es interagiert neben BP180 mit Integrin  $\beta 4$  (94). Autoantikörper beim BP richten sich hauptsächlich gegen die globuläre C-terminale Domäne des BP230 (12, 40, 156). 50-70% der Patienten weisen Antikörper gegen BP230 auf (12, 22, 96, 132, 158, 173). Die pathogenetische Rolle von BP230 ist allerdings noch unklar, in Tiermodellen konnte keine pathogenetische Bedeutung nachgewiesen werden (52). Es scheint keine Korrelation zwischen der Höhe der Antikörper und der Krankheitsaktivität zu geben (102).

Weitere Proteine der dermo-epidermalen Junctionszone sind das Laminin  $\gamma 1$  /p200 Protein, welches das Zielantigen des dem BP ähnlichen Anti-Laminin  $\gamma 1$ /p200-Pemphigoids ist (63), Typ VII Kollagen, typisch für die Epidermolysis bullosa acquisita und Laminin 332, welches als Zielantigen beim Schleimhautpemphigoid vorkommt (142) (Abb. 1).

Die Tatsache, dass Patienten mit BP Antikörper gegen verschiedene Epitope von BP180 aufweisen, lässt sich auf das sogenannte Epitope-Spreading zurückführen. Hierbei kommt es durch einen Gewebeschaden dazu, dass Strukturen freigelegt werden, die zuvor unzugänglich für das Immunsystem waren. Dies führt zu einer erneuten Immunantwort mit Antikörperbildung. Den Shift von Antikörpern gegen extrazelluläre Domänen von BP180 zur Antikörperbildung gegen intrazelluläre Bereiche des gleichen Proteins, bezeichnet man als intrazelluläres Epitope-Spreading. Zudem kommt es auch zum interzellulären Epitope-Spreading: Nachdem vorerst nur Antikörper gegen BP180 vorliegen, kommt es im Verlauf zur Antikörperbildung gegen BP230 (20, 21, 41).



**Abb. 1: Darstellung der dermo-epidermalen Junktionszone**

Dargestellt sind die Hauptzielantigene der Pemphigoiderkrankungen: BP180, BP230, Laminin  $\gamma$ 1, Laminin 332,  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 Integrin und Typ VII Kollagen. Abbildung modifiziert nach Holtsche et al. 2018 (74).

### 1.3 Pathophysiologie

Die Pathophysiologie des BP wurde anhand von in vitro Untersuchungen mit kultivierten Keratinozyten, ex vivo Modellen mit Kryoschnitten humaner Haut und in vivo mit Hilfe verschiedener Tiermodelle untersucht.

1993 konnten Liu et al. mit einem passiven Tiermodell erstmals die Bedeutung von Antikörpern gegen BP180 in der Pathogenese des BP in vivo belegen: Die Autoren immunisierten Kaninchen mit einem rekombinanten Fragment von murinem BP180. Die vom Kaninchen produzierten und aufgereinigten Antikörper wurden in neonatale Mäuse injiziert und führten bei diesen zu einer sowohl klinisch, histologisch als auch immunologisch dem BP entsprechenden Hauterkrankung (106). Da die Blasenbildung in diesem Mausmodell immer mit Komplement C3-Ablagerungen an der Basalmembranzzone sowie der Infiltration mit Neutrophilen einhergegangen ist, führte dieses Modell zur Theorie der Komplement-vermittelten Pathogenese beim BP (106).

Nishie et al. gelang es 2007 ein humanisiertes Mausmodell zu entwickeln (123). Dazu wurden zuerst Knockout Mäuse für murines Col17(BP180) ( $COL17^{m-/-}$ ) mit Mäusen, die humanes BP180 exprimieren ( $COL17^{h+}$ ), gekreuzt. Anschließend wurden heterozygote  $COL17^{m+/-}$  Mäuse mit  $COL17^{m+/,h+}$  Mäusen gekreuzt und somit COL17-humanisierte Mäuse ( $COL17^{m-/-,h+}$ ) erzeugt. Die intraperitoneale Injektion von Antikörpern von BP Patienten in diese neonatalen COL17-humanisierten Mäuse ( $COL17^{m-/-,h+}$ ) führte zu Erythemen und der Induzierbarkeit einer Blase durch Reibung. Histologisch zeigten sich eine dermo-epidermale Spaltbildung sowie ein Entzündungsinfiltrat, bestehend aus Neutrophilen und Lymphozyten. In der direkten Immunfluoreszenz ließen sich lineare IgG-Ablagerungen entlang der dermo-epidermalen Junktionszone entsprechend denen bei BP Patienten nachweisen. Somit entstand ein zuverlässiges Tiermodell in Bezug auf die Übertragbarkeit der Erkrankung vom Patienten. In der gleichen Arbeit zeigten die Autoren in diesem Mausmodell, dass die Therapie mit einem rekombinanten Peptid, welches das pathogenetisch relevante Epitop von BP180 beinhaltet, zur deutlichen Reduktion der Blasenbildung führt.

2011 gelang es Hirose et al. erstmals ein „aktives“ Mausmodell zu etablieren: Mäuse wurden mit einer rekombinanten Form der 15. nicht kollagenösen Domäne des murinen BP180 (entspricht der humanen 16. nicht kollagenösen Domäne) immunisiert und entwickelten innerhalb von 14 Wochen dem BP entsprechende Hautveränderungen (71).

Die Bindung von Autoantikörpern an BP180 führt zur Aktivierung von Komplement an der dermo-epidermalen Junctionszone. Es gibt allerdings auch Belege für Komplement unabhängig vermittelte Mechanismen der Spaltbildung beim BP (35, 121, 162). Im Gegensatz hierzu zeigten Liu et al. im neonatalen Mausmodell, dass die Aktivierung von Komplement Voraussetzung für die Induktion einer Blase ist (107). In *in vitro* Untersuchungen mit kultivierten humanen Keratinozyten konnte nach Inkubation mit Anti-BP180 IgG die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-8 nachgewiesen werden (138). Dem folgt die Degranulation von Mastzellen, welche zur Einwanderung weiterer Entzündungszellen (Neutrophile, Eosinophile und Makrophagen) in die Haut führt (24, 25). Diese bilden Proteasen sowie reaktive Sauerstoffspezies und führen somit letztendlich zum Verlust der Verbindung der basalen Keratinozyten mit der darunter liegenden Dermis und dementsprechend zur subepidermalen Spaltbildung (142).

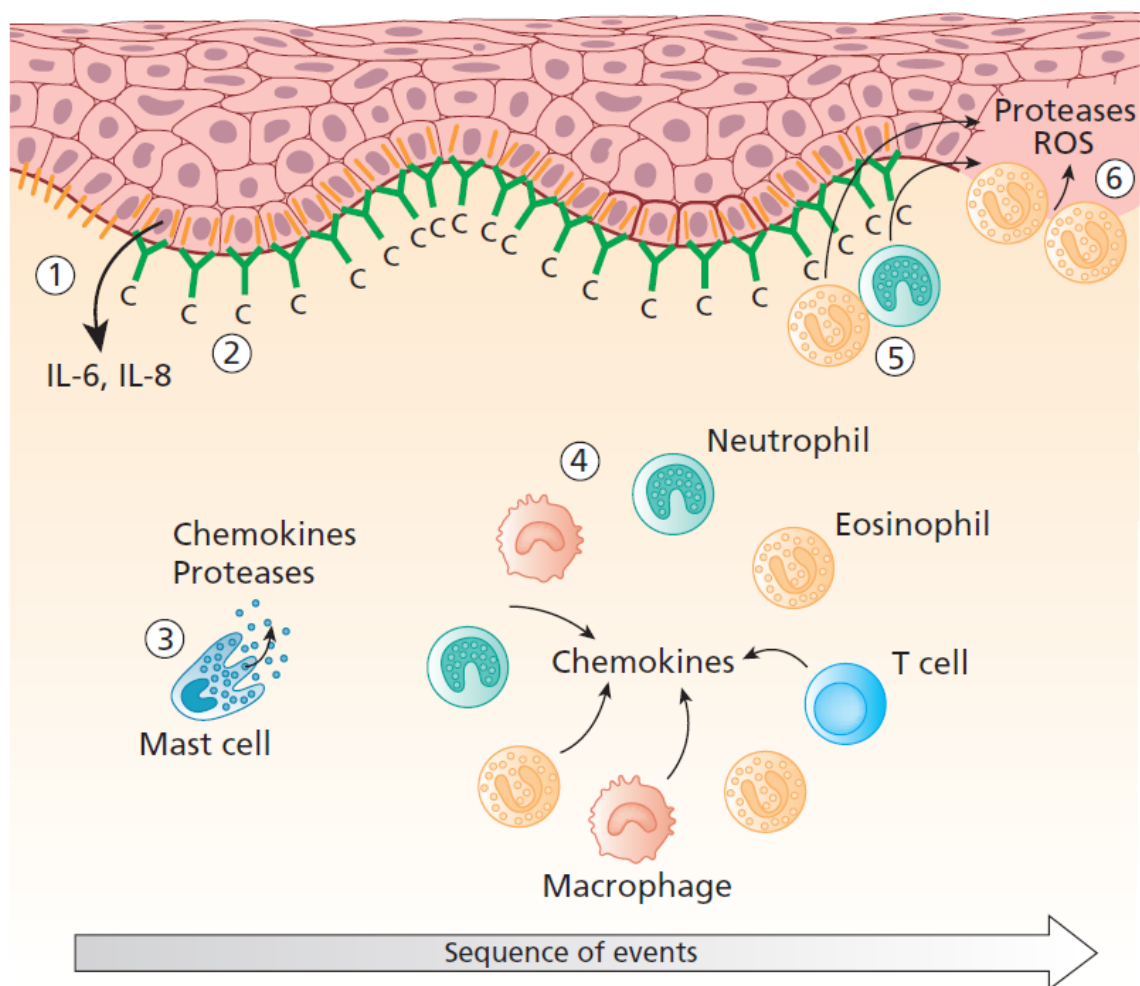
An Kryoschnitten humaner Haut konnte nach Inkubation mit Anti-BP180 NC16A IgG und der Zugabe von Leukozyten gesunder Spender eine Fc (crystallisable fragment) vermittelte Spaltbildung gezeigt werden (49, 151, 154, 175). In diesem Modell ging der Spaltbildung eine Freisetzung der Matrixmetalloproteinase-9 und neutrophiler Elastase voraus.

Schulze et al. konnten in einem adulten passiven Mausmodell zeigen, dass die Blasenbildung beim BP von den Fc $\gamma$  Rezeptoren IIB, III und IV vermittelt wird (148). Mit diesem Modell ist die Untersuchung der Auswirkung von anti-inflammatorischen Mediatoren an bereits erkrankten Mäusen möglich.

Die pathophysiologische Bedeutsamkeit von IgE Antikörpern gegen BP180 konnte bisher *in vitro* und in zwei Mausmodellen nachgewiesen werden (49, 115, 183).

So konnten Fairley et al. durch Injektion von IgE Antikörpern von BP Patienten in humane Hauttransplantate auf athymischen, nackten Mäusen erythematöse Plaques induzieren. Auch das Auftreten von urtikariellen Läsionen (39) und der bei nahezu allen Patienten vorhandene Juckreiz (142) sind ein Indiz für die pathogenetische Relevanz der IgE Antikörper beim BP.

Im Gegensatz zur Bedeutung von Anti-BP180 Antikörpern ist die pathophysiologische Rolle von Antikörpern gegen BP230 noch nicht belegt, bisherige Mausmodelle konnten keine Relevanz nachweisen (52). Abb. 2 fasst die Pathogenese des BP zusammen.



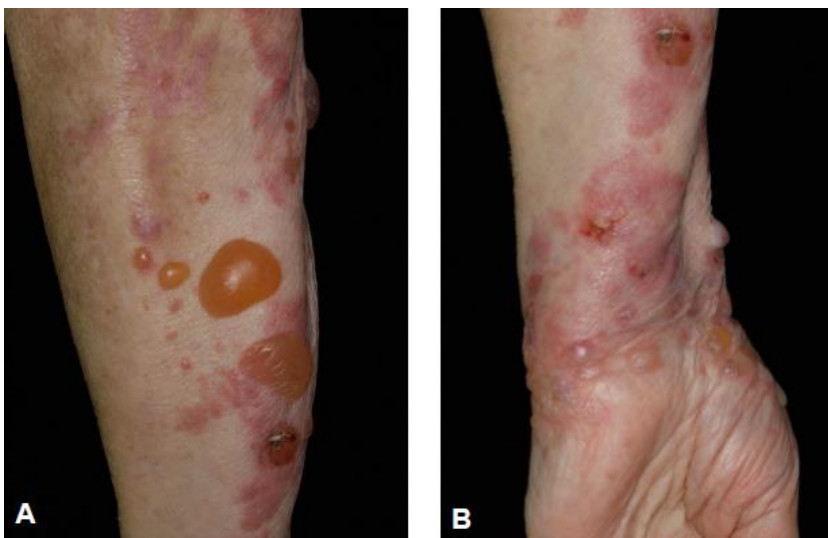
**Abb. 2: Pathogenese des BP**

Die Bindung von Autoantikörpern an BP180 führt zur Aktivierung von Komplement an der dermo-epidermalen Junctionszone sowie zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-8 aus basalen Keratinozyten und der Degranulation von Mastzellen. Dies führt zur Einwanderung weiterer Entzündungszellen (Neutrophile, Eosinophile und Makrophagen) in die Haut. Diese bilden Proteasen sowie reaktive Sauerstoffspezies und führen somit letztendlich zum Verlust der Verbindung der basalen Keratinozyten mit der darunterliegenden Dermis und dementsprechend zur subepidermalen Spaltbildung. Abbildung entnommen aus Schmidt und Zillikens 2013 (142).

## 1.4 Klinik

Häufig beginnt die Erkrankung mit generalisiertem Juckreiz, Erythem und urtikariellen Plaques. Dieses Prodromalstadium kann Wochen bis Monate anhalten, bei wenigen Patienten bleibt dies die einzige Manifestation der Erkrankung (142). Anschließend bilden sich pralle, mit seröser Flüssigkeit gefüllte Blasen am gesamten Integument (Abb. 3). Bevorzugt betroffen sind das Abdomen, die Beugeseiten von Armen und Beinen sowie die Intertrigines. Eine orale Schleimhautbeteiligung tritt bei ca. 20% der Patienten auf (146). Im Verlauf platzen die Blasen auf, bilden Krusten und heilen unter postinflammatorischen Hyper- und/oder Hypopigmentierungen ohne Narbenbildung ab (141). Die Erkrankung verläuft schubweise rezidivierend, eine spontane Abheilung ist möglich. Das Nikolski-II Phänomen, das heißt die seitliche Verschieblichkeit einer bestehenden Blase durch Druck, ist beim BP positiv. Nikolski-I, das heißt die Induktion einer Blase durch seitlichen Druck, ist allerdings im Gegensatz zum Pemphigus negativ. Bei einigen Patienten bestand ein klarer zeitlicher Zusammenhang des Ausbruchs der Erkrankung mit Verbrennungen, Trauma, UV-Licht, Strahlentherapie oder Impfungen (146).

Zur Objektivierung des klinischen Befundes kann der Bullous Pemphigoid Disease Area Index (BPDAI) verwendet werden, ein Score, der einzeln Erosionen/Blasen, Erytheme/Urtikaria und postinflammatorische Pigmentierungen an Haut und Schleimhäuten sowie den Pruritus erhebt (118).

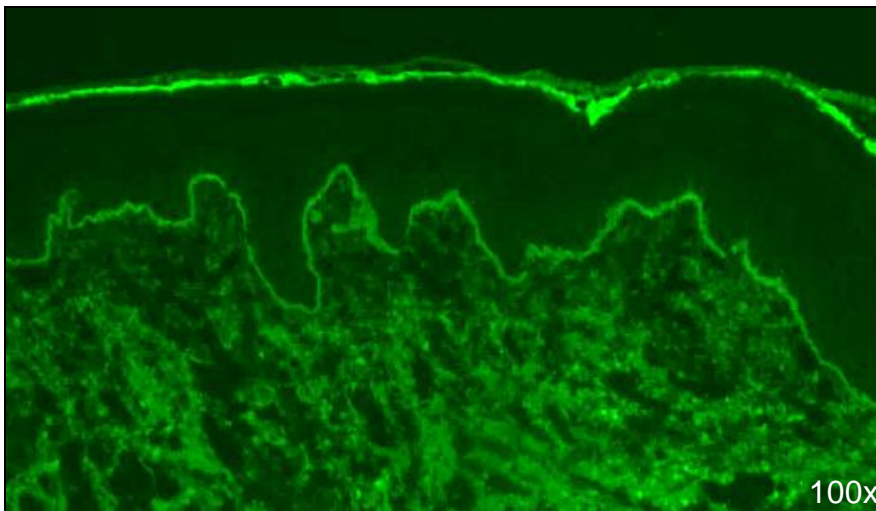


**Abb. 3: Klinische Bilder eines BP Patienten**

Pralle Blasen, Erosionen und Krusten auf erythematösem Grund am Unterarm (A) und am Handgelenk (B) eines BP Patienten.

## 1.5 Diagnostik

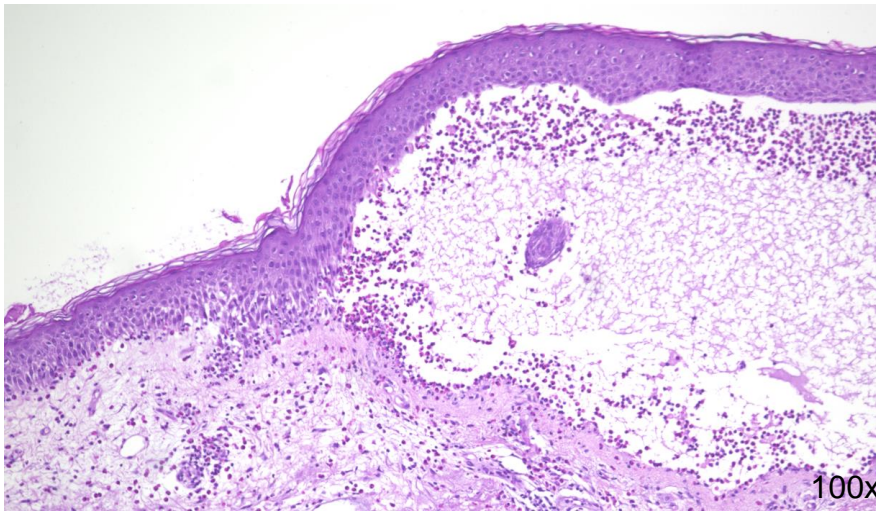
Als Goldstandard in der Diagnostik des BP gilt die direkte Immunfluoreszenz, in der gewebstgebundene Autoantikörper nachgewiesen werden können (140). Hierzu wird eine Hautprobe aus gesund erscheinender Haut aus der direkten Umgebung einer Blase (periläsional) entnommen. In dieser können lineare IgG- oder C3-Ablagerungen an der dermo-epidermalen Junctionszone nachgewiesen werden (Abb. 4) (142).



**Abb. 4: Direkte Immunfluoreszenz einer periläsionalen Hautprobe (DIF) eines BP Patienten**

In der DIF einer periläsionalen Hautbiopsie sieht man lineare Antikörper-Ablagerungen entlang der Basalmembran bei Beschichtung mit Anti-IgG, 100x.

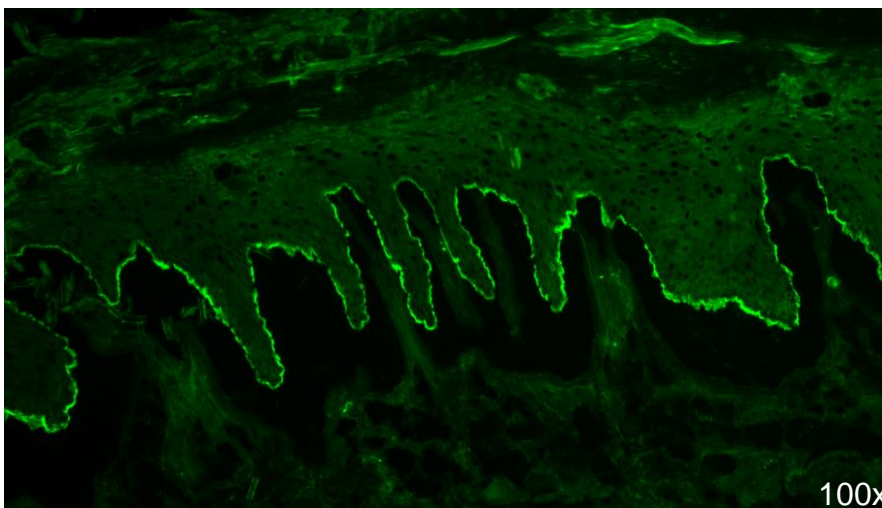
Für die histopathologische Untersuchung sollte eine frische Blase zusammen mit etwas angrenzender gesunder Haut biopsiert werden. Es zeigt sich eine subepidermale Spaltbildung, im Blasenlumen finden sich eosinophile und neutrophile Granulozyten sowie Fibrin. In der Dermis lässt sich ein gemischtzelliges Infiltrat mit vielen eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, wenigen Makrophagen und T-Lymphozyten sowie Spongiose und Ödem nachweisen (Abb. 5) (146).



**Abb. 5: Histologie einer läsionalen Hautprobe eines BP Patienten**

In der histologischen Probe sind eine subepidermale Spaltbildung sowie eosinophile und neutrophile Granulozyten sowohl im Blasenlumen als auch in der oberen Dermis zu sehen, H&E, 100x.

Zusätzlich werden mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF) zirkulierende Autoantikörper im Serum der Patienten nachgewiesen. Hierzu wird Patientenserum auf mittels 1 M NaCl gespaltener humaner Haut inkubiert, die gebundenen Autoantikörper mit Hilfe eines fluoreszierenden Zweitantikörpers gegen humanes IgG/IgA angefärbt und so fluoreszenzmikroskopisch als lineare Ablagerung am Dach der artifiziellen Blase sichtbar gemacht (Abb. 6) (58). Auf diese Weise lassen sich bei BP Patienten mit einer sehr hohen Sensitivität von 70 – 95% Antikörper gegen die dermo-epidermale Junctionszone nachweisen (58, 60, 92, 109, 132).

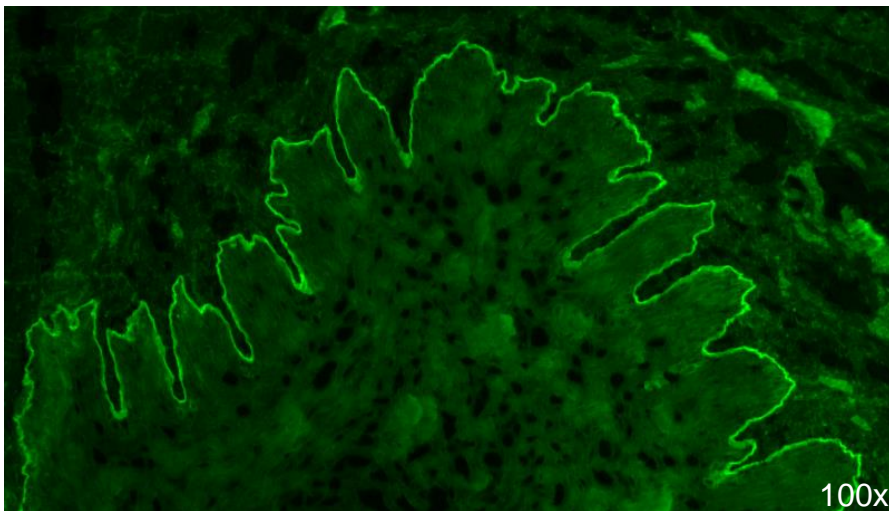


**Abb. 6: Indirekte Immunfluoreszenz (IIF) auf humaner Spalthaut beim BP**

In der IIF sind lineare IgG- Ablagerungen am Blasendach der artifiziellen Blase auf humaner Spalthaut nach Inkubation mit einem BP Serum zu sehen, 100x.

Wird die IIF auf Affenösophagus durchgeführt, so lässt sich ebenfalls eine lineare Fluoreszenz entlang der Basalmembran nachweisen (Abb. 7). Allerdings ist die Sensitivität zum Nachweis eines BP auf Affenösophagus mit 60-70% deutlich geringer (22, 87, 92).

Da bei dieser Methode nicht zwischen Antikörpern gegen die verschiedenen Strukturen der dermo-epidermalen Junctionszone unterschieden werden kann, werden zusätzlich mittels kommerziell erhältlichen ELISAs die IgG-Autoantikörperspiegel gegen BP180 NC16A und BP230 im Serum bestimmt. Durch Immunoblots lassen sich bei unklaren Untersuchungsergebnissen Antikörper gegen weitere Proteine der dermo-epidermale Junctionszone, zum Beispiel gegen Laminin 332, Laminin  $\gamma$ 1/p200 Protein und LAD-1 nachweisen. Da die Krankheitsaktivität mit der Höhe der Autoantikörperspiegel gegen BP180 NC16A korreliert, dient der Wert auch zum Monitoring im Verlauf der Erkrankung (93, 137, 161, 166).



**Abb. 7: Indirekte Immunfluoreszenz (IIF) auf Affenösophagus beim BP**

In der IIF sind lineare IgG-Ablagerungen entlang der Basalmembran auf Affenösophagus nach Inkubation mit einem BP Serum zu sehen, 100x.

In einem relativ neuen, kommerzialisierten und dadurch weithin verfügbaren Verfahren lassen sich mittels IIF in nur einem Inkubationsschritt IgG Autoantikörper gegen die verschiedenen Zielantigene der blasenbildenden Autoimmundermatosen nachweisen. Hierzu sind auf einem sogenannten BIOCHIP Mosaik® verschiedene miniaturisierte Substrate, Organschnitte (Affenösophagus, Spalthaut), transfizierte humane Zellen (BP230, Desmoglein 1 und 3) und BP180 NC16A-Tetramere aufgetragen. So kann mittels dieser Untersuchung bereits zwischen einer Pemphigoid- (Antikörper gegen BP180/230, Ablagerungen entlang der Basalmembran auf Affenösophagus und Spalthaut) und einer Pemphiguserkrankung (Antikörper gegen Desmoglein 1/3, interzelluläre Ablagerungen im Affenösophagus) differenziert werden (134, 159, 164, 176).

## 1.6 Therapie

In der 2015 erstmals erschienenen Leitlinie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft zur Diagnostik und Therapie des Pemphigus vulgaris/foliaceus und des BP wird das BP zur stadiengerechten Therapie in drei Schweregrade unterteilt: mild (<10% betroffene Körperoberfläche), mittelschwer (10-30%) und schwer (>30%) (144). Beim milden BP wird die topische Anwendung von Glukokortikoiden, zum Beispiel 0,05%ige Clobetasolpropionat-Salbe, zweimal täglich empfohlen. Prinzipiell sollen die prallen Blasen der Patienten steril eröffnet werden, die Blasendecke soll als Schutz belassen werden. Zur antiseptischen Behandlung kann zum Beispiel 1% Triclosan in das topische Glukokortikoid gemischt werden. Beim mittelschweren BP können additiv zur Lokalthherapie systemische Glukokortikoide angewendet werden. Dabei sollte initial eine Dosierung von 0,5 mg/kg KG/Tag Prednisolonäquivalent nicht überschritten werden. Als alternative Monotherapie oder als adjuvante Medikation zur Einsparung von systemischen Glukokortikoiden können Dapson, Azathioprin, Doxycyclin, Mycophenolat-Mofetil sowie Methotrexat zum Einsatz kommen. Beim schweren BP sollte immer eine Kombination aus Lokal- und Systemtherapie angewandt werden.

Neuere Therapiemöglichkeiten bei therapierefraktären Fällen sind die intravenöse (i.v.) Gabe von hochdosierten Immunglobulinen (IVIG) als Pulstherapie, die Immunadsorption/Plasmapherese sowie der Anti-CD-20 Antikörper Rituximab. Auch die Gabe von Cyclophosphamid kann erwogen werden. Bei Patienten mit IgE Antikörpern gegen BP180 konnte in Fallstudien eine gute Wirksamkeit von Omalizumab, einem monoklonalen IgE-Inhibitor, nachgewiesen werden (50, 108, 174).

Falls systemische Kortikosteroide zum Einsatz kommen, sollte die Dosis bei kontrollierter Krankheitsaktivität (keine neuen Läsionen und Beginn der Abheilung bestehender Läsionen) langsam reduziert und schließlich ausgeschlichen werden. Ist eine dauerhafte Therapie mit Steroiden nötig, sollte die Dosis unterhalb der Cushingschwelle von 7,5 mg/d Prednisolonäquivalent liegen. Im Falle eines Rezidivs wird eine erneute Dosissteigerung empfohlen. Auch andere Immunsuppressiva sollen im Verlauf reduziert werden (47).

Bisher wurden lediglich neun kontrollierte randomisierte Studien zur Therapie des BP publiziert. Untersucht wurde die Therapie mit topischen sowie oralen Kortikosteroiden, Azathioprin, Dapson, Plasmapherese, Mycophenolatmofetil und Nicotinamid plus Tetrazyklin (145). Letztere Therapie führte im Vergleich zur Therapie mit Prednisolon 40-80 mg/Tag zu weniger Nebenwirkungen, in der Effektivität wurde kein Unterschied festgestellt (53). Zwei Studien untersuchten die Plasmapherese als Therapieoption des BP. Im Vergleich zur Monotherapie mit oralen Steroiden (0,3 mg/kg KG/Tag Prednisolon) führte die zusätzliche Durchführung der Plasmapherese zur Einsparung der oralen Steroide (130). In einer zweiten Studie wurde die additive Durchführung der Plasmapherese mit der zusätzlichen Therapie mit Azathioprin sowie der Monotherapie mit Prednisolon verglichen. Es konnten keine Unterschiede in der Effektivität festgestellt werden, allerdings kam es im Azathioprin-Arm zu mehr schweren Nebenwirkungen (69).

Bereits 2002 konnten Joly et al. nachweisen, dass beim mittelschweren BP eine intensive Lokalthherapie mit Steroiden (40 g/Tag 0,05% Clobetasolpropionat) einer oralen Kortikosteroidtherapie mit 0,5 mg/kg KG/Tag Prednisolon nicht unterlegen ist (83). Eine nachfolgende Studie zeigte, dass eine geringere Dosis topischer Steroide (10-30 g täglich) zu weniger Nebenwirkungen führt und es keinen Unterschied in der Dauer bis zur Krankheitskontrolle bei Patienten mit mittelschwerem BP gibt, es allerdings häufiger zu Rezidiven kommt als bei der intensiven topischen Therapie (85). In Bezug auf die Therapie des schweren BP wurden bei der Therapie mit 1 mg/kg KG/Tag Prednisolon im Vergleich zur intensiven topischen Therapie eine erhöhte 1-Jahres-Mortalität und mehr Nebenwirkungen beobachtet (83).

Da die systemische Therapie mit oralen Steroiden häufig zu erheblichen Nebenwirkungen führt, untersuchten verschiedene Studien die kombinierte Therapie mit oralen Steroiden und anderen Immunsuppressiva, um eine Einsparung der oralen Steroide und damit eine Reduktion der Nebenwirkungen zu erreichen. So führt die zusätzliche Therapie mit Azathioprin 2,5 mg/kg KG/Tag zu einer möglichen Einsparung der oralen Kortikosteroide (Prednisolon) (15). Allerdings konnten in einer anderen Studie keine Unterschiede in der klinischen Wirkung zwischen der additiven Therapie mit Azathioprin und Mycophenolat-

Mofetil (jeweils plus Prednisolon) festgestellt werden (7). Sticherling et al. verglichen kürzlich die adjuvante Therapie von Azathioprin mit Dapsone jeweils in Kombination mit Methylprednisolon. Dapsone schien dabei einen größeren Kortikosteroid-sparenden Effekt als Azathioprin zu haben, allerdings wurde auf Grund der kleinen Kohorte eine statistische Signifikanz knapp verfehlt ( $n=0.06$ ) (7). Jüngst erschien eine kontrollierte prospektive Studie zur Therapie von unter Prednisolon ( $\geq 0,4$  mg/kg KG/Tag) refraktären BP Patienten mit IVIG. Amagai et al. zeigten, dass die Therapie mit 400 mg/kg KG/Tag IVIG über 5 Tage im Vergleich zur Placebogabe bei schwer betroffenen Patienten zur signifikanten Reduktion der Krankheitsaktivität an Tag 15 führte (1).

### **1.7 Bullous Pemphigoid Steroids and Tetracyclines (BLISTER) Studie**

In der multizentrischen prospektiven BLISTER (Bullous Pemphigoid Steroids and Tetracyclines) Studie wurde bei Patienten mit BP die Wirkung und Sicherheit zweier Therapien verglichen. Zu einem Inferioritätsansatz wurde die Hypothese geprüft, ob Doxycyclin bei deutlich geringeren Nebenwirkungen der Standardtherapie mit Prednisolon nicht signifikant unterlegen ist. In einer vorher durchgeführten Befragung britischer Dermatologen war eine Unterlegenheit in der Effektivität von 25% im Vergleich zu Prednisolon akzeptabel, wenn die Nebenwirkungen signifikant weniger wären.

Im Rahmen der Studie wurden 253 Patienten aus 45 britischen und 7 deutschen Hautkliniken im Zeitraum von März 2009 bis Oktober 2013 rekrutiert. Einschlusskriterium war die klinische Diagnose BP, welche durch eine positive direkte oder indirekte Immunfluoreszenz bestätigt wurde. In der Woche vor Screening mussten mindestens drei Blasen oder Erosionen in mindestens zwei Körperregionen vorhanden sein. 132 Patienten erhielten 200 mg Doxycyclin täglich, 121 Patienten 0,5 mg/kg Körpergewicht Prednisolon täglich. Zusätzlich war in beiden Therapiearmen die lokale Therapie mit Mometasonfumarat  $\leq 30$  g/Woche in den ersten 3 Wochen erlaubt (ausschließlich auf befallener Haut). Bei allen Studienteilnehmern wurde bei Studieneinschluss der Schweregrad der Erkrankung in mild ( $<10$  Blasen), moderat (10-30 Blasen) oder schwer ( $>30$

Blasen) eingeteilt. Zudem wurde der Karnofsky Score erhoben. Während die Patienten wussten, in welchem Therapiearm sie sich befinden, waren die Untersucher bis zu Woche 6 verblindet. Zu den Studienvisiten nach 3, 6, 13, 26, 39 und 52 Wochen wurde jeweils die Anzahl der Blasen mit 0-3 und >3 angegeben sowie nach Nebenwirkungen gefragt. Es wurde außerdem angegeben, wenn die Patienten innerhalb der Nachbeobachtungszeit von 52 Wochen verstarben. Primäres Zielkriterium war die Wirksamkeit:  $\leq 3$  Blasen oder frische Erosionen nach Woche 6 wurden als Therapieerfolg gewertet. Zweites primäres Zielkriterium waren die Anzahl der Nebenwirkungen  $\geq$  Grad 3 innerhalb von 52 Wochen (18).

Die Hypothese der BLISTER Studie konnte bestätigt werden. Es wurde gezeigt, dass Doxycyclin bei weniger Nebenwirkungen Prednisolon in der Wirksamkeit nicht erheblich unterlegen ist. In der Prednisolon-Gruppe hatten 92 von 101 Patienten (91,1%)  $\leq 3$  Blasen nach Woche 6 im Vergleich zu 83 von 112 Patienten (74,1%) in der Doxycyclin-Gruppe. Dies ergibt einen Unterschied von 18,6%. 36,6% der Patienten im Prednisolon-Arm entwickelten Grad 3, 4 und 5 Nebenwirkungen innerhalb von 52 Wochen, in der Doxycyclin-Gruppe waren es hingegen lediglich 18,5%. Dies ergibt einen Unterschied von 19% ( $p=0,001$ ). Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die initiale Therapie mit Doxycyclin beim BP der Standardbehandlung mit Prednisolon bei erheblich günstigerem Nebenwirkungsprofil in der Kurzzeitwirksamkeit nicht wesentlich unterlegen ist (19).

## 2. Fragestellung

Das BP ist durch Autoantikörper gegen die Strukturproteine BP180 und BP230 charakterisiert (142). Der Großteil der BP Patienten weist zirkulierende IgG Autoantikörper gegen selbige Antigene auf (43). Eine Vielzahl von Patienten bildet zusätzlich Autoantikörper des IgA und IgE Isotyps (27, 43, 81, 95, 113). Für Anti-BP180 NC16A IgG konnte bereits früh eine Korrelation mit der Krankheitsaktivität gezeigt werden (93, 137, 161), wohingegen die vorliegenden Daten in Bezug auf IgE Autoantikörper weniger eindeutig sind (166). Die Serumspiegel von Anti-BP230 IgG konnten bisher nicht mit der Krankheitsaktivität in Zusammenhang gebracht werden (102). Dass pathophysiologisch nicht nur IgG Anti-BP180 NC16A, sondern auch IgE Autoantikörper relevant sind, konnte im Mausmodell gezeigt werden (49, 183). Die Kohorte der BLISTER Studie stellt eine der größten gut charakterisierten Gruppen von BP Patienten dar. Sie ist daher prädestiniert zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Höhe der Serumantikörperspiegel der verschiedenen Isotypen gegen die Zielantigene des BP und den zugehörigen klinischen Daten (66). Dazu wurden in dieser Arbeit die folgenden Fragestellungen bearbeitet. Die ersten drei Hypothesen wurden prospektiv formuliert, die anderen post hoc.

- ▶ Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Höhe der IgG/IgE Autoantikörperspiegel vor Therapiebeginn und dem klinischen Outcome?  
*Unterscheiden sich die zwei Therapiearme?*
- ▶ Gibt es einen Zusammenhang zwischen der initialen Höhe der IgG/IgE Autoantikörperspiegel und der Anzahl der Blasen vor Therapiebeginn?
- ▶ Gibt es einen Zusammenhang zwischen der initialen Höhe der IgG/IgE Autoantikörperspiegel und dem Karnofsky Score?
- ▶ Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Höhe der IgG/IgE Autoantikörperspiegel und der Anzahl an unerwünschten Ereignissen?
- ▶ Haben Patienten, die während der Nachbeobachtungszeit verstarben höhere IgG/IgE Autoantikörperspiegel zu Therapiebeginn?
- ▶ Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Alter und der Höhe der IgG/IgE Autoantikörperspiegel zu Therapiebeginn?
- ▶ Haben Patienten, die ein Rezidiv hatten, höhere IgG/IgE Autoantikörperspiegel zu Therapiebeginn?

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Patienten und Design**

Alle in dieser Arbeit untersuchten Patientenserum und die dazugehörigen klinischen Daten stammen aus der BLISTER Studie. Im Rahmen der BLISTER Studie konnten die Patienten optional an der vorliegenden Studie teilnehmen, die den Zusammenhang von Biomarkern und klinischen Parametern untersucht. Hierfür wurde kein weiteres Serumröhrchen abgenommen. Ein erneuter Patientenkontakt für diese Arbeit fand nicht statt. Das Serum wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 20°C gelagert.

In die BLISTER Studie eingeschlossen wurden Patienten über 18 Jahre, die sich in einer dermatologischen Klinik oder Praxis mit dem Verdacht auf ein BP mit mind. 3 Blasen ( $\geq 5$ mm Durchmesser) an mindestens zwei Körperregionen in der letzten Woche vorstellten. Die Diagnose wurde mittels direkter und/oder indirekter Immunfluoreszenz gesichert (lineare IgG- und/oder C3-Ablagerungen an der dermo-epidermalen Junktionszone). Ausschlusskriterien waren die Diagnose eines Schleimhautpemphigoids, eine BP-Episode im letzten Jahr sowie die Einnahme von Studienmedikamenten in den letzten 12 Wochen (18).

Insgesamt wurden für die vorliegende Arbeit Serumproben von 143 Patienten der BLISTER Studie untersucht, davon waren 69 Frauen und 74 Männer. Die serologischen Ergebnisse wurden anschließend auf einen Zusammenhang mit den klinischen Daten der Patienten wie bereits in der Fragestellung beschrieben untersucht. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck am 19.11.2009 positiv beurteilt (Nr. 09-134).

### **3.2 Indirekte Immunfluoreszenz**

Bei der indirekten Immunfluoreszenz werden zirkulierende Autoantikörper nachgewiesen. Als Substrat für die Kryoschnitte dienten in 1 M NaCl inkubierte

humane Haut sowie Affenösophagus. Die einzelnen Schnitte wurden, um ein Verlaufen der Proben zu verhindern, mit dem Dako-Pen (Dako, Glostrup, Dänemark) getrennt. Anschließend wurde jeweils 50 µl der Positiv- und Negativ-Kontrollen sowie der Patientenseren (1:10 in PBS (Phosphate buffered saline) verdünnt) aufgetragen und für 30 Minuten bei 37°C (Inkubator) in einer schwarzen Feuchtigkeitskammer inkubiert. Als Positivkontrollen dienten Patientenseren von Epidermolysis bullosa acquisita sowie BP Patienten, als Negativkontrolle normales humanes Serum (NHS). Anschließend wurden die Objektträger in einer Küvette mit PBS für 3 mal 10 Minuten auf einem Schüttler gewaschen. Danach wurde jeweils 50 µl des Fluoreszin-Isothiocyanat-markierten Zweitantikörpers anti-human IgG/FITC bzw. anti-human IgA/FITC in einer Verdünnung von 1:100 in PBS auf die Schnitte aufgetragen. Nach einer erneuten Inkubation von 30 Minuten bei 37°C erfolgte der nächste Waschschrift gemäß dem ersten. Direkte Sonneneinstrahlung wurde vermieden. Abschließend wurden die Objektträger mit Mowiol (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) beträufelt und mit Deckgläsern eingedeckt. Die fertigen Schnitte können bei 4°C in einer Mappe lagern. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit 20x Objektiv. Es wurde zwischen einer linearen Fluoreszenz am Blasendach der artifiziiellen Blase und einer linearen Fluoreszenz am Blasenboden, dem Vorkommen einer linearen Fluoreszenz sowohl am Blasenboden und am Blasendach und dem Fehlen einer spezifischen Fluoreszenz, was als negativ galt, unterschieden. (58, 91) Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Verwendete Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenz**

Bezeichnung	Typ	Verdünnung	Funktion
Patienten, NHS, PK	Patientenserum	1:10	Erstantikörper
Anti-Human (Bio-Rad Laboratories, München)	Konjugat F(ab') <sub>2</sub> -Anti-Human-IgA (FITC markiert)	1:100	Zweitantikörper
Anti-Human (Bio-Rad Laboratories, München)	Konjugat F(ab') <sub>2</sub> -Anti-Human-IgG (FITC markiert)	1:100	Zweitantikörper

NHS:normales humanes Serum; PK:Positivkontrolle; FITC:Fluoresceinisothiocyanat.

### 3.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur quantitativen Bestimmung der IgG Antikörper gegen BP230 und BP180 NC16A wurden die kommerziell erhältlichen ELISA der Firma Euroimmun (Lübeck, Deutschland) verwendet. Die Tests wurden nach Herstelleranleitung durchgeführt. Im ersten Schritt wurden jeweils 100 µl der Kalibratoren, Positiv- und Negativkontrollen (gebrauchsfertig im Kit enthalten) sowie der verdünnten Patientenseren auf die 96 Well Platte aufgetragen und anschließend für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Dann folgte der erste Waschschrift: Die Wells wurden 3mal mit je 300 µl Waschpuffer (im Kit enthalten, 1:10 mit Aqua destillata (Aqua dest.) verdünnt) gewaschen und anschließend auf Fließpapier ausgeschlagen, so dass keine Rückstände in den Wells verblieben. Im nächsten Schritt wurde je Well 100 µl Enzymkonjugat aufgetragen und erneut für eine halbe Stunde bei RT inkubiert. Im Anschluss folgte der nächste Waschschrift gemäß dem ersten. Anschließend wurde je 100 µl Substrat pipettiert und nach 15 Minuten Inkubation bei RT und Schutz vor direkter Sonneneinstrahlung die Reaktion mit einer Stopp-Lösung beendet. Die Auslesung erfolgte mittels photometrischer Messung der Extinktion der Lösung (Opysy MR Microplate Reader; Dynex Technologies GmbH, Denkendorf). Mittels der Relevation QuickLink Software 24077 (Dynex Technologies GmbH, Denkendorf) wurden die Extinktionen der Proben mit Hilfe der Kalibratoren in relative Einheiten (RE/ml) umgerechnet. Alle verwendeten Materialien außer Aqua dest. waren im Kit gebrauchsfertig enthalten. Als positiv wurden wie vom Hersteller empfohlen Werte  $\geq 20$  RE/ml gewertet.

Für die Untersuchung der BP180 NC16A IgE Antikörper steht kein kommerzieller ELISA zur Verfügung. Es wurden der BP180 NC16A IgG ELISA der Firma Euroimmun verwendet. Als Detektionsantikörper wurde der Anti-IgE-Antikörper der Firma Euroimmun eingesetzt. Es wurde jeweils 30 µl der unverdünnten Patientenseren sowie der zwei Positiv- und Negativkontrollen inkubiert, ansonsten wurde der Test entsprechend dem BP180 NC16A IgG ELISA durchgeführt. Die Auslesung erfolgte am ELISA Reader. Die Probenwerte ergaben sich aus der Extinktion der Probe nach Abzug des Leerwertes (Aqua dest. statt Probe) und wurden im Zusammenhang mit ihrem Gesamt IgE Wert, welcher mittels ELISA (Euroimmun) bestimmt wurde, ausgewertet. Es konnte kürzlich gezeigt werden,

dass die Serum IgE Antikörper gegen BP180 bei Patienten mit BP von den Spiegeln des Gesamt IgE im Serum beeinflusst werden. Deswegen wurden 3 unterschiedliche interne Nachweisgrenzen in Abhängigkeit des Gesamt IgE festgelegt (Tab. 3) (166).

**Tabelle 3: Testauswertung BP180 NC16A IgE**

<b>Gesamt IgE (U/ml)</b>	<b>Probenwert positiv</b>
<100 U/ml	$\geq 0,037$
100-500 U/ml	$\geq 0,113$
>500 U/ml	$\geq 0,173$

### **3.4 BIOCHIP Mosaik®**

Im BIOCHIP Mosaik® (Euroimmun) lassen sich in einem Inkubationsschritt gleichzeitig sechs verschiedene Substrate inkubieren. Somit kann in einem Versuchsansatz das Vorhandensein von verschiedenen IgG Antikörpern qualitativ bestimmt werden. Die Grundlage dieser Methode bildet die indirekte Immunfluoreszenz. Die eingesetzten Substrate waren: Primatenoesophagus, NaCl-separierte Spalthaut, Desmoglein-1- und 3-exprimierende Zellen, BP230-exprimierende Zellen (gC) und BP180-NC16A Tetramere.

Zuerst wurden die Proben im Verhältnis 1:10 mit PBS-Tween (hergestellt aus 1 Packung „Salz für PBS“, 2 ml Tween 20 und 1l Ampuwa Spüllösung, 20 Minuten rühren (schlierenfrei)) verdünnt. Anschließend wurden je 30 µl der Positiv- und Negativkontrollen (gebrauchsfertig im Kit enthalten) sowie der verdünnten Patientenseren auf ein Feld des Reagenzträgers pipettiert. Nachdem alle Proben aufgetragen wurden, wurden die Objektträger in die Aussparung des Reagenzträgers gelegt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss folgte der erste Waschschrift: Die Objektträger wurden mit einem Schwall PBS-Tween abgespült, sofort in eine vorbereitete Glas-Küvette mit PBS-Tween gestellt und für 5 Minuten auf einem Rotationsschüttler gewaschen. In der Zwischenzeit wurde je Feld 25 µl des markierten Antiserums auf einen separaten Reagenzträger pipettiert. Nach Abschluss des Waschschriftes wurden innerhalb von 5 Sekunden

die Rückseite und Unterkante der Objektträger abgetrocknet, wieder in die Aussparungen des Reagenzträgers gelegt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Direkte Sonneneinstrahlung wurde vermieden. Anschließend wurden die Objektträger erneut entsprechend dem ersten Waschschrift gewaschen. Mittels Styropor-Eindeckhilfe wurden je Feld 10 µl Eindeckmedium auf ein Deckglas aufgetragen. Nachdem die Rückseite und alle vier Kanten der Objektträger abgetrocknet wurden, wurden diese mit den BIOCHIPS nach unten auf das Deckglas gelegt und festgedrückt. Die Auswertung der Fluoreszenzmuster erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit 20x Objektiv.

### **3.5 Immunoblot**

Der Immunoblot dient der semi-quantitativen Bestimmung von Antikörpern im Serum. Hierzu binden im ersten Reaktionsschritt die Serumantikörper an die entsprechenden Antigene auf der Nitrozellulosemembran. Nach Inkubation mit einem Enzym-markierten Zweitantikörper werden die gebundenen Antikörper durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht.

In der vorliegenden Studie wurden folgende Immunoblots durchgeführt: LAD-1 im Überstand kultivierter HaCaT Keratinozyten, BP180 NC16A (rekombinant), Laminin  $\gamma$ 1 (rekombinant), Laminin 332 in extrazellulärer Matrix kultivierter HaCaT Keratinozyten, nicht-kollagene Domäne 1 (NC-1) des humanen Typ VII Kollagen (rekombinant) sowie das p200 Protein und Typ VII Kollagen im dermalen Extrakt. Die Nitrozellulosemembranen wurden freundlicherweise vom Autoimmunlabor der Hautklinik Lübeck bereitgestellt. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 (Seite 25) dargestellt.

Die Durchführung der Immunoblots wird exemplarisch am Beispiel des Immunoblots zum Nachweis von Antikörpern gegen LAD-1 beschrieben: Die Nitrozellulosemembran (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) wurde in die benötigte Anzahl von Streifen (je ca. 2 mm breit) geschnitten und beschriftet. Jeder Streifen wurde in einer Inkubationswanne mit 1 ml 5% Magermilchpulver (MMP) (Carl Roth) in 1x TBST aus Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Serva

Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland), Natriumchlorid (NaCl, Carl Roth), Tween 20 (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland) und Aqua dest. für eine Stunde bei RT auf dem Schüttler inkubiert um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurden die Inkubationswannen ausgekippt und 3x 10 Sekunden mit 1x TBST ab gespült. Die Patientenproben wurden im Verhältnis 1:100 mit 1% Bovine serum albumin (BSA, Carl Roth) in 1x TBST verdünnt, auf die Streifen in den Inkubationswannen gegeben und über Nacht bei 2-10°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde 3x 10 Sekunden mit 1x TBST ab gespült, dann 12 Minuten in 1x TBST auf dem Schüttler gewaschen, dieser Waschschrift wurde wiederholt. Als nächstes wurde der polyklonale Kaninchen-Anti-Human-IgG-HRP-markierte Zweitantikörper 1:500 in 1x TBST + 1% BSA verdünnt, die Streifen in einen Falcon mit dem verdünnten Antikörper gegeben und für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der erste Waschschrift wiederholt. Zur Entwicklung der Streifen wurde 1 Tablette Diaminobenzidin (DAB, Merck, Darmstadt, Deutschland) in 10 ml destilliertem Wasser aufgelöst und 20 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) zugefügt. Nun wurden zuerst die Positiv- sowie Negativkontrollen in der Lösung entwickelt, bis eine Bande in den Positivkontrollen sichtbar wurde, die Negativkontrollen jedoch negativ blieben. Alle anderen Streifen wurden dann gleich lange entwickelt. Anschließend wurden die Streifen in destilliertem Wasser gewaschen, getrocknet und aufgeklebt. (139)

Die Durchführung des Immunoblots mit rekombinantem BP180 NC16A (IgA) erfolgte in gleicher Weise, einziger Unterschied war die Probenverdünnung in 5% MMP mit 1% BSA in 1x TBST. (180) Bei der Durchführung des Immunoblots zum Nachweis von IgA Antikörpern gegen LAD-1 wurden die Patientenproben 1:20 mit 1% BSA in 1x TBST verdünnt, der polyklonale Zweitantikörper Kaninchen-Anti-Human-IgA-HRP-markierte Antikörper wurde 1:50 in 1% BSA in 1x TBST verdünnt. Die Immunoblots zum Nachweis von Antikörpern gegen Laminin  $\gamma$ 1 (67), Laminin 332 (101), die nicht-kollagene Domäne 1 (NC-1) von humanem Typ VII Kollagen (100) sowie p-200 und Typ VII Kollagen (in dermalem Extrakt) (67) wurden entsprechend dem LAD-1 Immunoblot mit folgenden Modifikationen durchgeführt: Die Proben wurden 1:50 mit 5% MMP in 1x TBST verdünnt. Beim Nachweis von Antikörpern gegen die nicht-kollagene Domäne 1 (NC-1) von

humanem Typ VII Kollagen, Laminin  $\gamma$ 1 sowie p-200 und Typ VII Kollagen (in dermalem Extrakt) wurde der Maus Anti-Human IgG4 – HRP -markierte Antikörper 1:2.000 in 5% MMP + 1% BSA in 1x TBST verdünnt, beim Nachweis von Anti-Laminin 332 Antikörpern wurde der gleiche Zweitantikörper 1:10.000 verdünnt. Die Entwicklung erfolgte beim Immunoblot zum Nachweis von p-200 und Typ VII Kollagen (in dermalem Extrakt) und der nicht-kollagene Domäne 1 (NC-1) von humanem Typ VII Kollagen entsprechend dem Immunoblot zum Nachweis von Antikörpern gegen LAD-1 mittels DAB für 10 Minuten.

Beim Nachweis von Antikörpern gegen Laminin 332 sowie Laminin  $\gamma$ 1 erfolgte die Entwicklung mittels ECL-Prime bzw. ECL (GE Medical Systems Information Technologies GmbH, Freiburg, Deutschland). Dazu wurden die Streifen auf eine Klarsichtfolie aufgeklebt und mit 1x TBST befeuchtet. In der Dunkelkammer wurden die Streifen abgetupft, das ECL bzw. ECL-Prime auf die Laminin  $\gamma$ 1- bzw. Laminin 332-Streifen aufpipettiert und 1 bzw. 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Reagenzien abgetupft und die Klarsichtfolie mit einer weiteren Klarsichtfolie zusammen in eine x-Ray-Film-Kassette gelegt, ein Film oben aufgelegt und die Kassette geschlossen. Der Film wurde nach 2 Sekunden, 20 Sekunden, 1, 2, 4 und 8 Minuten wieder herausgeholt, für 20 Sekunden in den Entwickler (BW Plus Röntgen GmbH, Kamp-Lintfort, Deutschland), anschließend ca. 10 Sekunden in Leitungswasser, danach ca. 60 Sekunden in den Fixierer (BW Plus Röntgen GmbH) und dann erneut ca. 2 Minuten in Leitungswasser gelegt. Anschließend wurde der Film herausgenommen und getrocknet.

Als Positivkontrollen dienten Patientenseren sowie beim Nachweis von Antikörpern gegen Laminin 332 zusätzlich rekombinante Antikörper gegen die  $\alpha$ 3-,  $\beta$ 3- und  $\gamma$ 2-Kette. Als Negativkontrollen wurden NHS verwendet.

**Tabelle 4: Verwendete Antikörper im Immunoblot**

Blot	Bezeichnung	Typ	Verdünnung	Funktion
Überstand kultivierter HaCaT Keratinozyten: Nachweis LAD-1 (IgG)	Patienten, NHS, PK	Patientenserum	1:100	Erstantikörper
	Anti-Human (Dako, Hamburg)	Polyklonales Kaninchen-Anti-Human-IgG (HRP markiert)	1:500	Zweitantikörper
Überstand kultivierter HaCaT Keratinozyten: Nachweis LAD-1 (IgA)	Patienten, NHS, PK	Patientenserum	1:20	Erstantikörper
	Anti-Human (Dako, Hamburg)	Polyklonales Kaninchen-Anti-Human-IgA (HRP-markiert)	1:50	Zweitantikörper
Dermales Extrakt: Nachweis des p200 Proteins und Typ VII Kollagen	Patienten, NHS, PK	Patientenserum	1:50	Erstantikörper
	Anti-Human (Southern Biotech, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching)	Monoklonales Maus-Anti-Human-IgG4 (HRP markiert) 0,5 mg/ml	1:2.000	Zweitantikörper
Extrazelluläre Matrix kultivierter HaCaT Keratinozyten: Nachweis von Laminin 332, BP180 und BP230	Anti-LAMA3 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)	Polyklonales Kaninchen, C-Terminaler Antikörper	1:10.000	Erstantikörper
	Anti-Laminin beta-3 Antikörper (H-300) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)	Polyklonales Kaninchen -IgG	1:100.000	Erstantikörper
	Anti-Laminin gamma-2 Antikörper (E6) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)	Monoklonales Maus-IgG1 200 µg/ml	1:100.000	Erstantikörper
	Patienten, NHS, PK	Patientenserum	1:50	Erstantikörper

	Anti-Human (Southern Biotech, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching)	Monoklonales Maus-Anti-Human-IgG4 (HRP markiert) 0,5 mg/ml	1:10.000	Zweitantikörper
	Anti-Kaninchen (Dako, Hamburg)	Ziege-Anti-Kaninchen IgG (HRP markiert)	1:10.000	Zweitantikörper
	Anti-Maus (Dako, Hamburg)	Kaninchen-Anti-Maus-IgG (HRP markiert)	1:100.000	Zweitantikörper
Laminin $\gamma$ 1	Patienten, NHS, PK	Patientenserum	1:50	Erstantikörper
	Anti-Human (Southern Biotech, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching)	Monoklonales Maus-Anti-Human-IgG4 (HRP markiert) 0,5 mg/ml	1:2.000	Zweitantikörper
NC-1	Patienten, NHS, PK	Patientenserum	1:50	Erstantikörper
	Anti-Human (Southern Biotech, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching)	Monoklonales Maus-Anti-Human-IgG4 (HRP markiert) 0,5 mg/ml	1:2.000	Zweitantikörper
BP180 NC16A	Patienten, NHS, PK	Patientenserum	1:100	Erstantikörper
	Anti-Human (Dako, Hamburg)	Polyklonales Kaninchen-Anti-Human-IgA (HRP-markiert)	1:500	Zweitantikörper

NHS:normales humanes Serum; PK:Positivkontrolle; HRP:Horseradish-Meerrettichperoxidase; LAD-1:Lineare-IgA-Dermatose Antigen 1; NC-1:nicht-kollagene Domäne 1 von humanem Typ VII Kollagen.

### 3.6 Statistik

Auf Grund der hohen Anzahl von Patienten mit negativen oder sehr hohen Autoantikörperspiegeln wurden die Werte in niedrige versus hohe bzw. im Fall von BP230 negativ versus positiv kategorisiert. Die Grenzen lagen für BP180 IgG, BP180 IgE und Gesamt IgE bei 250 RE/ml, 0,05 OD und 500 RE/ml. Wenn Daten analysiert wurden, die nach der Behandlung mit Prednisolon oder Doxycyclin erhoben wurden, wurde die Behandlungsstrategie als Kovariate in der Analyse berücksichtigt. Für alle Vergleiche wurden p-Werte von zweiseitigen Testverfahren ermittelt. P-Werte unter 0,05 sind als Hinweise auf eine statistische Signifikanz zu sehen. Auf eine Adjustierung für multiples Testing wurde verzichtet.

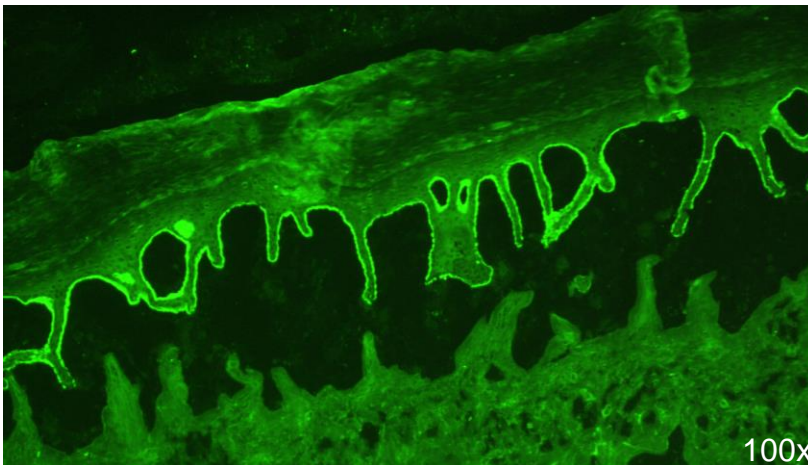
Für die Untersuchung der Assoziation der Autoantikörperspiegel mit der Erkrankungsschwere bezogen auf die initiale Anzahl an Blasen wurde der Cochran-Armitage Trendtest genutzt. Hierbei wurden die Autoantikörperspiegel, in niedrige versus hohe Antikörperspiegel dichotomisiert, als binomiale und die Anzahl der Blasen als ordinale Variable verwendet. Der Mann-Whitney U-Test wurde verwendet, um einen Unterschied des Karnofsky Scores bzw. des Alters zwischen den beiden Gruppen, Patienten mit hohen versus niedrigen Autoantikörperspiegeln, zu testen.

Um die Beziehung zwischen den initialen Autoantikörperspiegeln und der Krankheitsaktivität (>3 Blasen versus  $\leq$ 3 Blasen) im Verlauf bzw. der Mortalität als abhängige Variablen zu untersuchen, wurden logistische Regressionsmodelle entwickelt, die die Behandlungsform als Kovariate berücksichtigen. Mögliche Assoziationen zwischen den Autoantikörperspiegeln und der Anzahl der Nebenwirkungen wurden mittels ordinaler oder logistischer Regressionsmodelle unter Berücksichtigung der Behandlungsform als Kovariate untersucht. Die statistische Auswertung wurde in enger Abstimmung mit Prof. Dr. rer. biol. hum. Inke König, Institut für medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck, durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Indirekte Immunfluoreszenz

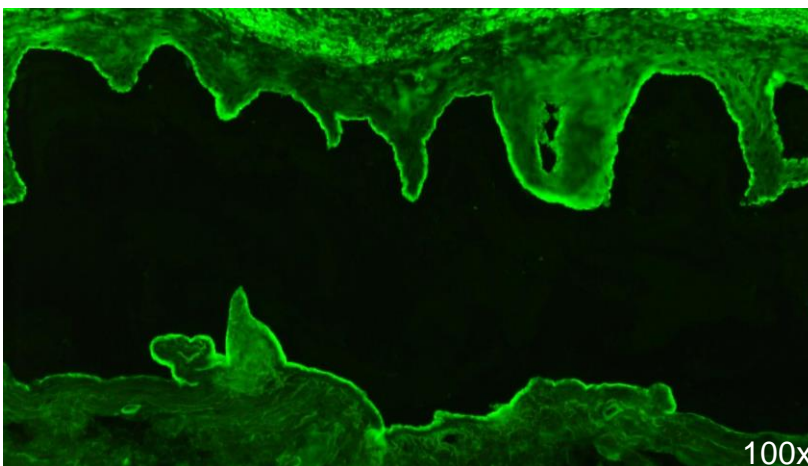
In 126 der 143 untersuchten Seren (88,1%) ließen sich in der IIF auf humaner Spalthaut IgG-Ablagerungen an der epidermalen (Blasendach) Seite des artifiziellen Spalts nachweisen (Abb. 8).



**Abb. 8: Epidermale Ablagerungen in der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) auf humaner Spalthaut**

In der IIF sind lineare IgG-Ablagerungen am Blasendach der artifiziellen Blase auf humaner Spalthaut zu sehen, 100x.

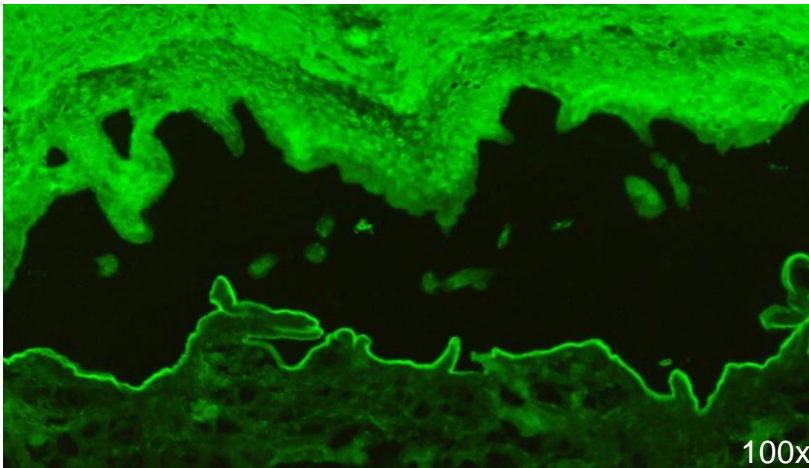
In 5 Seren (3,5%) konnte IgG mit Bindung an die epidermale und dermale (Blasenboden) Seite des Spalts detektiert werden (Abb. 9).



**Abb. 9: Epidermale und dermale Ablagerungen in der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) auf humaner Spalthaut**

In der IIF sind lineare IgG-Ablagerungen am Blasendach und -boden der artifiziellen Blase auf humaner Spalthaut zu sehen, 100x.

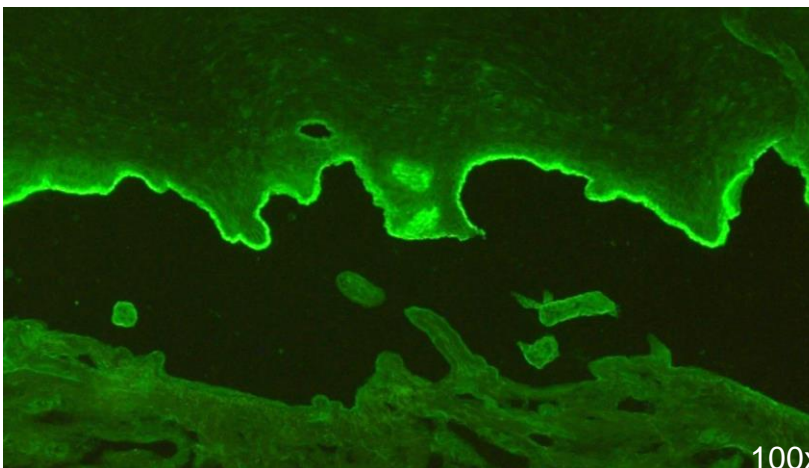
In 2 Seren (1,4%) band IgG ausschließlich an die dermale Seite der artifiziellen Blase (Abb. 10). In 10 Seren (7%) konnte kein zirkulierendes IgG in der IIF auf humaner Spalthaut festgestellt werden.



**Abb. 10: Dermale Ablagerungen in der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) auf humaner Spalthaut**

In der IIF sind lineare IgG-Ablagerungen am Blasenboden der artifiziellen Blase auf humaner Spalthaut zu sehen, 100x.

IgA Antikörper konnten in insgesamt 31 von 143 Seren (21,7%) nachgewiesen werden (Abb. 11), alle mit Bindung an die epidermale Seite der humanen Spalthaut.



**Abb. 11: Epidermale Ablagerungen in der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) auf humaner Spalthaut**

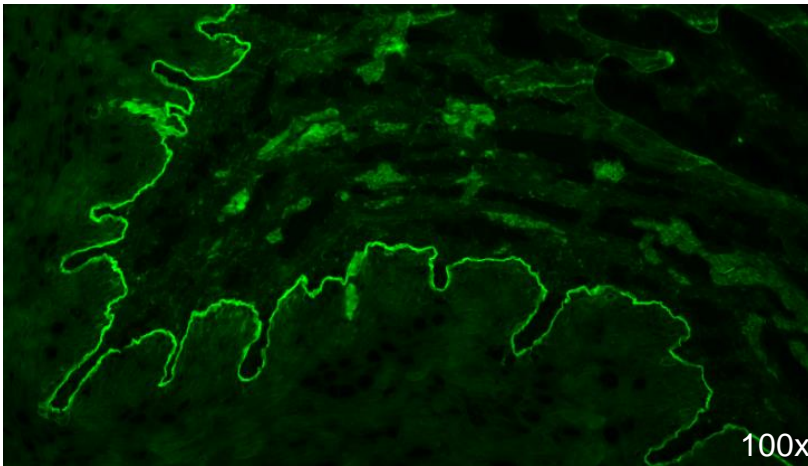
In der IIF sind lineare IgA-Ablagerungen am Blasendach der artifiziellen Blase auf humaner Spalthaut zu sehen, 100x.

**Tabelle 5: Ergebnisse der IIF auf Spalthaut**

Zweitantikörper	BD	BD+BB	BB	negativ
IgG	126 (88,1%)	5 (3,5%)	2 (1,4%)	10 (7%)
IgA	31 (21,7%)	0	0	112 (78,3%)

BD: Blasendach; BB: Blasenboden.

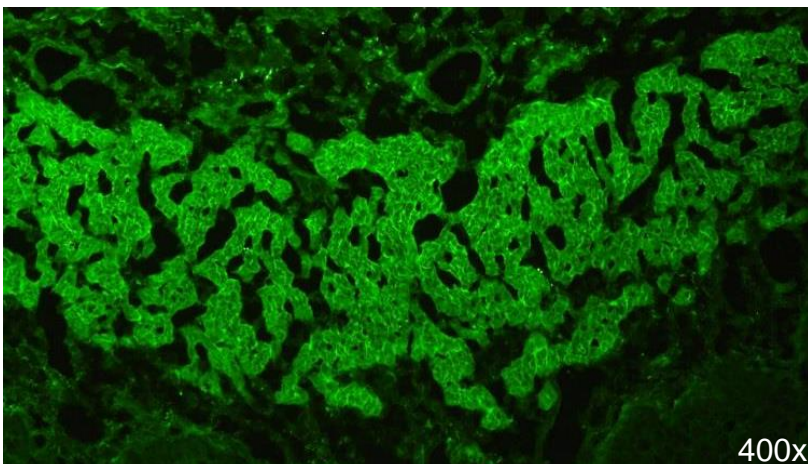
Die Seren, in welchen sich in der IIF mit humaner Spalthaut keine zirkulierenden IgG Antikörper nachweisen ließen, wurden mittels IIF auf Affenösophagus weiter untersucht. Hier konnte in einem von 10 untersuchten Seren IgG mit Bindung an die Basalmembran nachgewiesen werden (Abb. 12), 9 waren negativ.



**Abb. 12: Lineare Ablagerungen in der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) auf Affenösophagus**

In der IIF sind lineare IgG Ablagerungen entlang der Basalmembran auf Affenösophagus zu sehen, 100x.

In einem Serum ließen sich IgA Antikörper gegen Endomysium detektieren (Abb. 13). In diesem Serum wurden im ELISA IgA Antikörpern gegen Gewebstransglutaminase und Gliadin gefunden (Gewebstransglutaminase: 84 RE/ml; Gliadin: 200 RE/ml), somit konnte bei diesem Serum die Diagnose einer Dermatitis herpetiformis Duhring gestellt werden.



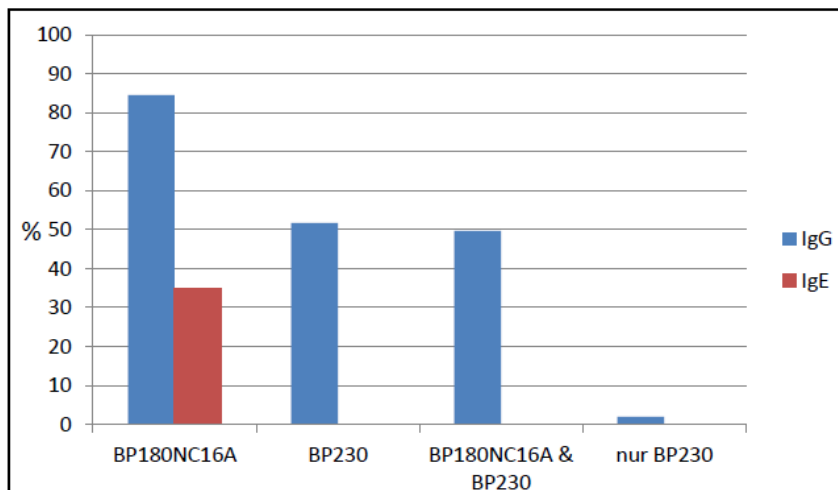
**Abb. 13: Ablagerungen am Endomysium in der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) auf Affenösophagus**

In der IIF sind IgA-Ablagerungen am Endomysium des Affenösophagus zu sehen, 400x.

## 4.2 ELISA

Alle 143 Seren wurden mittels ELISA auf IgG Antikörper gegen BP180 NC16A untersucht. Hier waren 121 (84,6%) Seren positiv. Der Maximalwert lag bei 8048 RE/ml, der Minimalwert bei 20,4 RE/ml (Cut-Off 20 RE/ml). Bei 48 von 138 (34,8%) Patienten konnten zusätzlich IgE Antikörper gegen BP180 NC16A nachgewiesen werden. Hier lag der niedrigste Wert bei 0,037, der höchste bei 1,601. 5 Seren konnten auf Grund von Mangel an Serum nicht untersucht werden.

Im BP230 IgG ELISA waren 74 von 143 (51,7%) Seren positiv, der Maximalwert lag bei 3268 RE/ml, der Minimalwert bei 22,1 RE/ml (Cut-Off 20 RE/ml). Drei der 74 (4%) BP230 positiven Seren waren negativ für BP180 NC16A IgG. Abbildung 14 fasst die Ergebnisse im ELISA zusammen.



**Abb. 14: Ergebnisse des BP180 NC16A und BP230 ELISA**

Die Anzahl der im ELISA zum Nachweis von IgG Antikörpern gegen BP180 NC16A und BP230 sowie IgE Antikörpern gegen BP180 NC16A positiv getesteten Seren ist in Prozent angegeben.

Im Gesamt IgE ELISA zeigten 62 von 138 (44.9%) erhöhte Gesamt IgE Werte (>100 RE/ml), der Maximalwert lag bei >500 RE/ml. 5 Seren konnten auf Grund von Mangel an Serum nicht untersucht werden.

### 4.3 BIOCHIP Mosaik®

Alle Seren wurden mit dem BIOCHIP Mosaik® untersucht. 65 Seren zeigten im Affenösophagus eine lineare Fluoreszenz entlang der Basalmembran. In der Spalthaut wiesen 107 Seren eine Fluoreszenz am Blasendach, 5 sowohl am Blasendach als auch am Blasenboden und ein Serum eine Fluoreszenz am Blasenboden auf. Reaktivität mit BP230 zeigten 61 Seren und mit BP180 117. Kein Serum zeigte eine positive Reaktion mit Desmoglein 1 oder Desmoglein 3 (Abb. 15). Tabelle 6 fasst die BIOCHIP Ergebnisse zusammen.

**Tabelle 6: Ergebnisse BIOCHIP Mosaik®**

	Spalthaut			Öso.	BP230	BP180	Des.1	Des. 3
	BD	BD+BB	BB	BM				
<b>pos.</b>	107 (74,8%)	5 (3,5%)	1 (0,7%)	65 (45,5%)	61 (42,7%)	117 (81,8%)	0	0
<b>neg.</b>	30 (21%)			78 (54,5%)	82 (57,3%)	26 (18,2%)	143 (100%)	143 (100%)

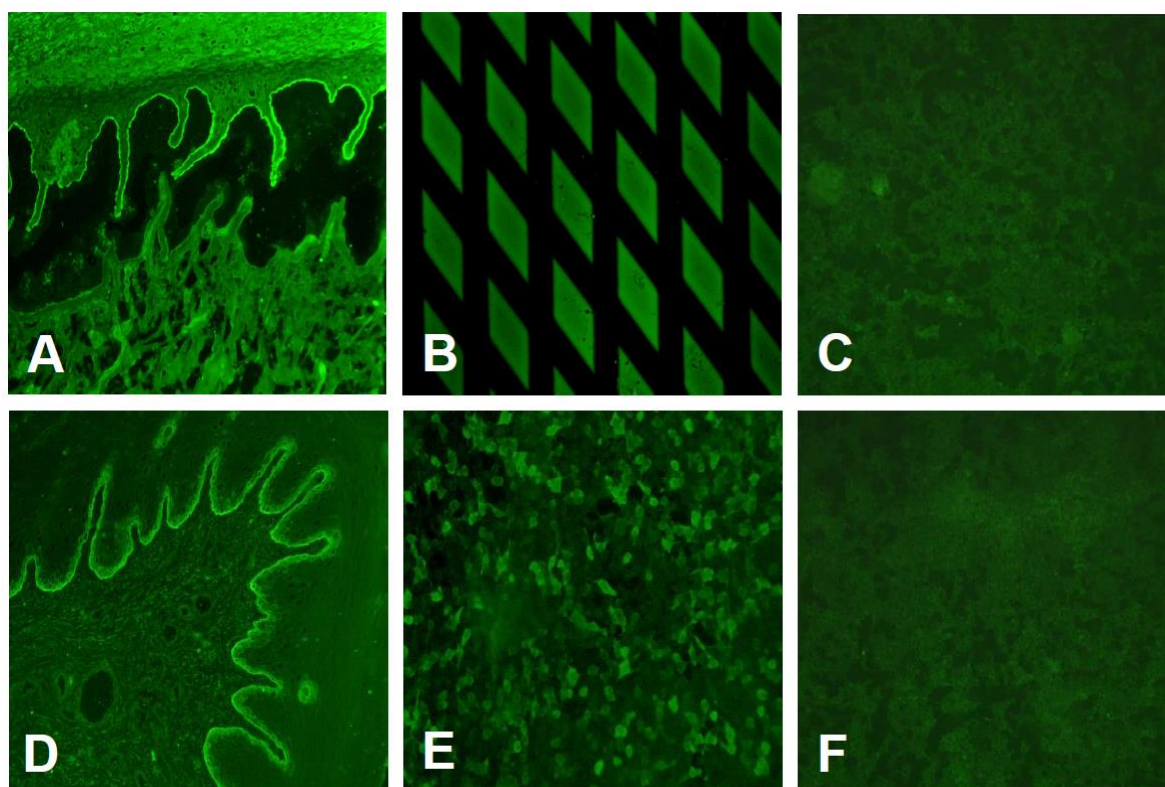
Öso.: Ösophagus; BD: Blasendach; BB: Blasenboden; BM: Basalmembran; pos.: positiv; neg.: negativ.

In Tabelle 7 werden die von den anderen Testverfahren abweichenden Ergebnisse des BIOCHIP dargestellt.

**Tabelle 7: Abweichende Ergebnisse des BIOCHIP Mosaik® von anderen Testverfahren**

	BIOCHIP	ELISA	n
<b>BP230</b>	-	+	17
	+	-	3
<b>BP180</b>	-	+	3
	+	-	1
	BIOCHIP	Konventionelle IIF	n
<b>Spalthaut/ Affenösophagus</b>	-	+	21
	+	-	1

IIF:indirekte Immunfluoreszenz; -:negativ; +:positiv.



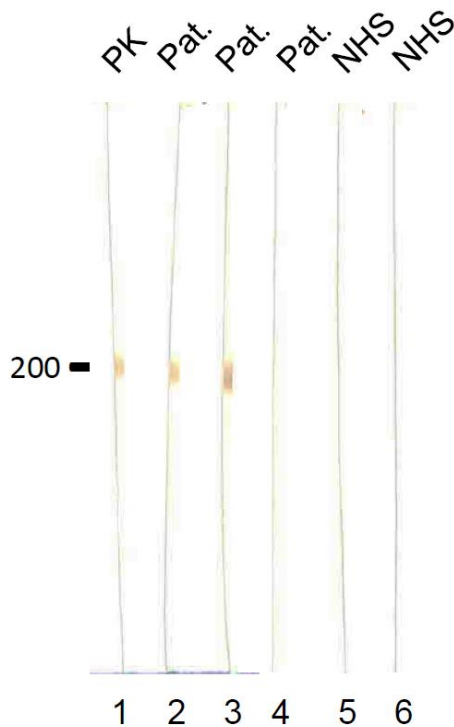
**Abb. 15: BP-typisches Muster im BIOCHIP Mosaik®**

Auf humaner Spalthaut sieht man lineare Antikörper-Ablagerungen am Blasendach (A), auf Affenösophagus entlang der Basalmembran (D). Das mit rekombinantem BP180 NC16A beschichtete Feld (B) sowie das mit BP230-exprimierenden HEK293 Zellen beschichtete Feld (E) zeigen deutliche Reaktivität nach Inkubation mit einem BP-Serum. Die Felder mit Desmoglein 1- (C) und 3- (F) exprimierenden HEK293 Zellen sind hingegen negativ.

## 4.4 Immunoblot

Alle Seren, bei denen in der IIF auf humaner Spalthaut IgG Antikörper mit Bindung an die dermale Seite des Spaltes detektiert wurden, sowie alle in der IIF auf humaner Spalthaut und im BP180 und BP230 ELISA negativ getesteten Seren wurden mittels Immunoblot zum Nachweis von Antikörpern gegen Laminin  $\gamma$ 1, Laminin 332, der nicht-kollagene Domäne 1 (NC-1) von humanem Typ VII Kollagen sowie p200 Protein und Typ VII Kollagen (in dermalem Extrakt) weiter untersucht.

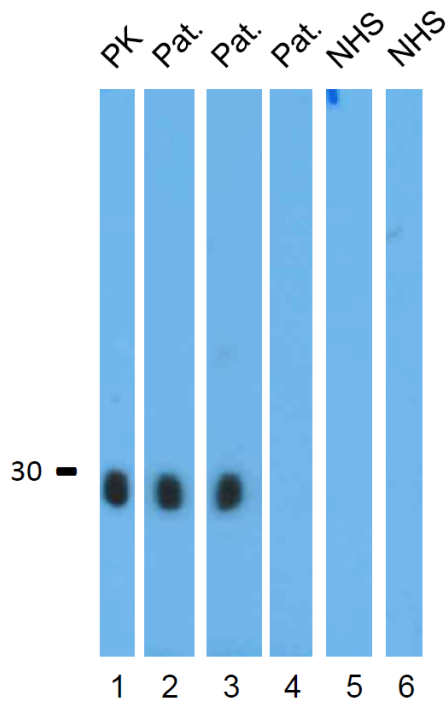
In 7 von den 17 weiter untersuchten Seren konnte eine Reaktivität gegen das 200 kDa schwere p200 Protein (in dermalem Extrakt) nachgewiesen werden (Abb. 16).



**Abb. 16: Immunoblot mit dermalem Extrakt zum Nachweis von Antikörpern gegen das p200 Protein**

Streifen 1 zeigt die Positivkontrolle (PK), welche nach Inkubation mit dem Anti-human-IgG<sub>4</sub>-Zweitantikörper eine Bande bei 200 kDa aufweist; Streifen 2 und 3 zeigen positive Patientenserum; Streifen 4 zeigt ein negatives Patientenserum, Streifen 5 und 6 zeigen die Negativkontrollen mit einem normalen humanem Serum (NHS). Links neben der Abbildung ist das Molekulargewicht in kDa angegeben.

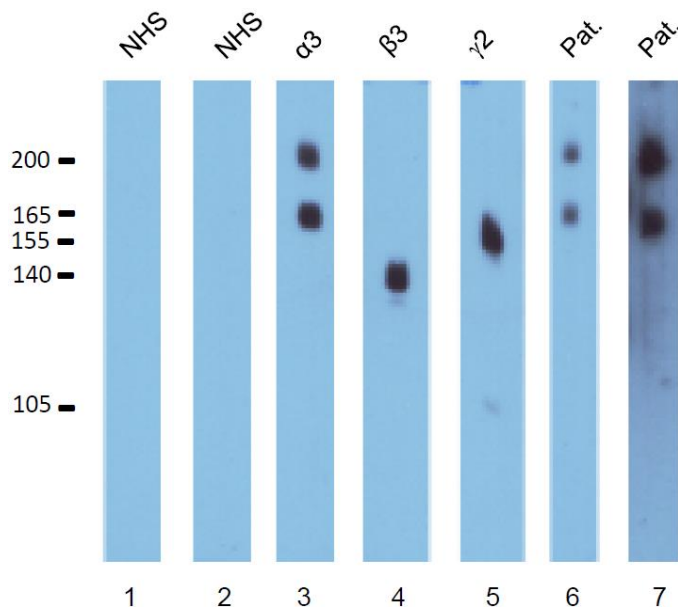
Alle 7 sowie 2 zusätzliche Seren zeigten sich positiv im Nachweis von Antikörpern gegen den rekombinanten c-Terminus von humanem Laminin  $\gamma$ 1 (hLAMC1-cterm) (Abb. 17), so dass bei diesen 9 Patienten die Diagnose eines p200-/Laminin  $\gamma$ 1 Pemphigoids gestellt werden konnte. In keinem der untersuchten Seren ließen sich Antikörper gegen Typ VII Kollagen nachweisen.



**Abb. 17: Immunoblot mit rekombinatem Laminin  $\gamma 1$**

Streifen 1 zeigt die Positivkontrolle (PK), welche nach Inkubation mit dem Anti-human-IgG<sub>4</sub>-Zweitantikörper eine Bande bei 28 kDa aufweist; Streifen 2 und 3 zeigen positive Patientenseren; Streifen 4 zeigt ein negatives Patientenserum; Streifen 5 und 6 zeigen die Negativkontrollen mit einem normalen humanem Serum (NHS). Links neben der Abbildung ist das Molekulargewicht in kDa angegeben.

In 3 von 17 Seren konnte Reaktivität gegen die  $\alpha 3$ -Kette von Laminin 332 nachgewiesen werden (Abb. 18) und ein Serum reagierte mit der  $\beta 3$ -Kette von Laminin 332. In diesen 4 Seren wurden zusätzlich IgG<sub>4</sub> Antikörper gegen das p200 Protein oder Laminin  $\gamma 1$  detektiert. Zusätzlich konnte in diesem Immunoblot in zwei Seren Reaktivität gegen BP180 und in einem Serum gegen BP230 nachgewiesen werden.



**Abb. 18: Immunoblot mit extrazellulären Matrix kultivierter HaCaT Keratinozyten zum Nachweis von Antikörpern gegen Laminin 332**

Streifen 1 und 2 zeigen die Negativkontrollen mit einem normalen humanem Serum (NHS); Streifen 3, 4 und 5 zeigen die Positivkontrollen mit rekombinanten  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$  und  $\gamma 2$  Antikörpern; die Streifen 6 und 7 zeigen positive Patientenseren mit Reaktivität gegen die  $\alpha 3$ -Kette, welche nach Inkubation mit dem Anti-human-IgG<sub>4</sub>-Zweitantikörper jeweils eine Bande bei 200 und 165 kDa aufweisen. Links neben der Abbildung ist das Molekulargewicht in kDa angegeben.

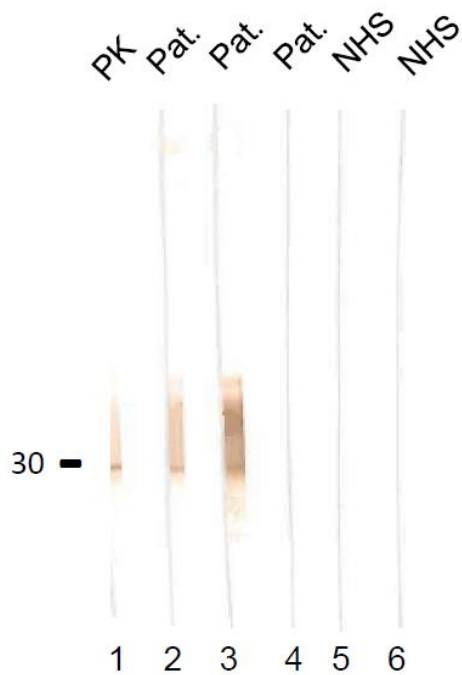
Die Seren, bei denen zwar mittels IIF auf humaner Spalthaut zirkulierende IgG Antikörper gegen die epidermale Seite des Spalts nachgewiesen wurden, allerdings im ELISA keine Antikörper gegen die 16. nicht kollagene Domäne von BP180 detektiert werden konnten, sowie alle in der IIF auf humaner Spalthaut und im BP180 und BP230 ELISA negativ getesteten Seren wurden mittels Immunoblot zum Nachweis von IgG Antikörpern gegen die lösliche Ektodomäne von BP180 (LAD-1) weiter untersucht. Hier zeigten 14 von 23 untersuchten Seren eine Reaktivität (Abb. 19).



**Abb. 19: Immunoblot mit Überstand kultivierter HaCaT Keratinozyten zum Nachweis von Antikörpern gegen LAD-1**

Streifen 1 zeigt die Positivkontrolle (PK), welche nach Inkubation mit dem Antihuman-IgG-Zweitantikörper eine Bande bei 120 kDa aufweist; Streifen 2 und 3 zeigen positive Patientenserum; Streifen 4 und 5 zeigen die Negativkontrollen mit einem normalen humanem Serum (NHS). Links neben der Abbildung ist das Molekulargewicht in kDa angegeben.

Die Seren, in denen mittels IIF auf humaner Spalthaut zirkulierende IgA Antikörper nachgewiesen wurden, sind mittels Immunoblot zum Nachweis von IgA Antikörpern gegen LAD-1 und das rekombinante BP180 NC16A weiter untersucht worden. Hier konnte in 16 (LAD-1) bzw. 19 (BP180 NC16A) von 31 untersuchten Seren eine Reaktivität nachgewiesen werden (Abb. 20). Zwei der Seren konnten auf Grund von nicht ausreichend vorhandenem Serum nicht weiter untersucht werden.

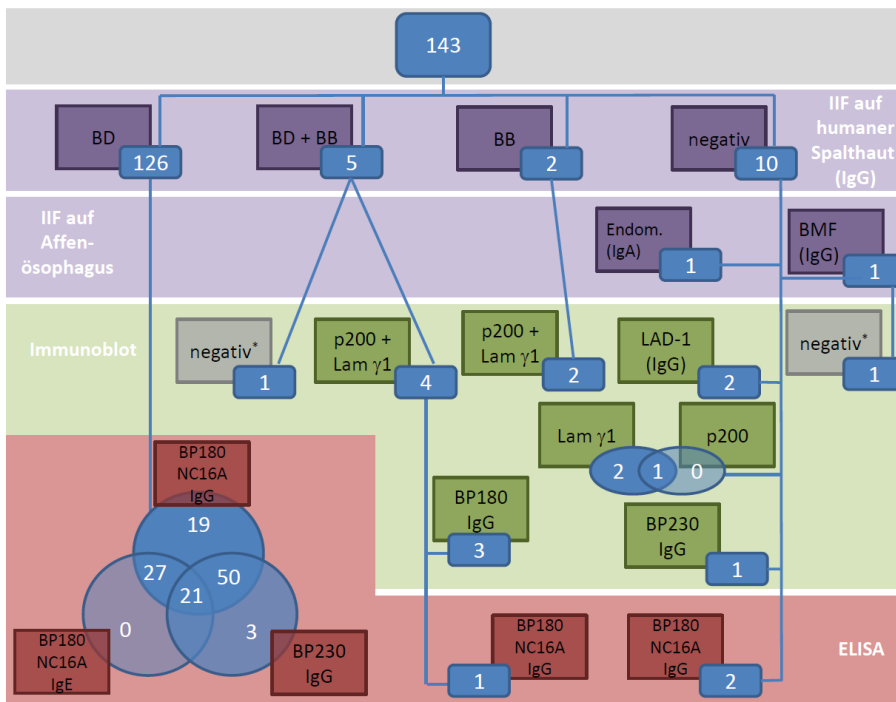


**Abb. 20: Immunoblot mit rekombinatem BP180 NC16A**

Streifen 1 zeigt die Positivkontrolle (PK), welche nach Inkubation mit dem Antihuman-IgA-Zweitantikörper eine Bande bei 30 kDa aufweist; Streifen 2 und 3 zeigen positive Patientenserum; Streifen 4 zeigt ein negatives Patientenserum; Streifen 5 und 6 zeigen die Negativkontrollen mit NHS. Links neben der Abbildung ist das Molekulargewicht in kDa angegeben.

#### 4.5 Zusammenfassung der serologischen Ergebnisse

126 von 143 Seren (88,1%) zeigten epidermale IgG Bindung in der IIF auf humaner Spalthaut. In 5 Seren (3,5%) wurden sowohl epidermale als auch dermale IgG-Ablagerungen nachgewiesen. Ausschließlich dermale IgG-Ablagerungen wurden in 2 Seren (1,4%) detektiert und 10 Seren (7%) waren negativ. In 4 der 5 Seren mit dermalen und epidermalen IgG-Ablagerungen konnten Antikörper gegen das p200 Protein und Laminin  $\gamma$ 1 sowie BP180 mittels Immunoblot und ELISA nachgewiesen werden. In einem der 5 Seren konnte das spezifische Zielantigen nicht identifiziert werden. In den 2 Seren mit ausschließlich dermaler Bindung konnten Antikörper gegen das p200 Protein und Laminin  $\gamma$ 1 nachgewiesen werden. Bei weiterer Untersuchung der 10 bisher unreaktiven Seren mittels IIF auf Affenösophagus konnte in einem Serum IgG Reaktivität gegen die Basalmembran sowie in einem Serum IgA Reaktivität gegen Endomysium nachgewiesen werden. In diesem Serum wurden im ELISA IgA Antikörper gegen Gewebstransglutaminase und Gliadin nachgewiesen. Von den 8 bisher unreaktiven Seren zeigten zwei Seren IgG gegen LAD-1, 3 IgG<sub>4</sub>-Reaktivität gegen Laminin  $\gamma$ 1 (eines zusätzlich gegen das p-200 Protein), eines Anti-BP230 IgG im Immunoblot und zwei Anti-BP180 IgG im ELISA. Abbildung 21 fasst die serologischen Ergebnisse zusammen.



**Abb. 21:**  
**Zusammenfassung**  
**der serologischen**  
**Ergebnisse**

\*negativ in allen weiteren Testverfahren;  
BD: Blasendach; BB: Blasenboden; IIF: indirekte Immunfluoreszenz; BMF: Basalmembranfluoreszenz; Endom.: Endomysium; p200: p200 Protein; Lam  $\gamma$ 1: Laminin  $\gamma$ 1; LAD-1: Lineare-IgA-Dermatose Antigen 1.

## 4.6 Klinische Angaben

Bei allen Studienteilnehmern wurde bei Studieneinschluss die Schwere der Erkrankung in mild (<10 Blasen), moderat (10-30 Blasen) oder schwer (>30 Blasen) eingeteilt sowie der Karnofsky Score erhoben. Zu den Studienvisiten nach 3, 6, 13, 26, 39 und 52 Wochen wurde jeweils die Anzahl der Blasen mit 0-3 und >3 angegeben sowie nach Nebenwirkungen gefragt. Es wurde außerdem angegeben, wenn die Patienten innerhalb der Nachbeobachtungszeit von 52 Wochen verstarben.

Auf Grund der serologischen Untersuchung der 143 Seren der BLISTER Studie wurden die 9 Patienten mit Anti-p200/Laminin  $\gamma$ 1 Pemphigoid oder Dermatitis herpetiformis Duhring aus weiteren Analysen ausgeschlossen.

Das mittlere Alter der Patienten betrug 77 ( $\pm$  11) Jahre. Die Patienten waren zwischen 40 und 98 Jahre alt. 39 Patienten zeigten eine milde, 57 eine moderate und 37 eine schwere Erkrankung zu Studieneinschluss. Im Prednisolon-Arm waren 12 Patienten mild, 28 moderat und 18 schwer erkrankt, im Doxycyclin-Arm 27 mild, 29 moderat und 19 schwer erkrankt (Tab. 8).

**Tabelle 8: Erkrankungsschwere vor Therapiebeginn**

Behandlungsarm Erkrankungsschwere	Doxycyclin	Prednisolon	Gesamt
mild	27	12	39
moderat	29	28	57
schwer	19	18	37

Mild: <10 Blasen; moderat: 10-30 Blasen; schwer: >30 Blasen.

Die 1-Jahres-Mortalität unserer Kohorte lag bei 13,5%, sowohl im Prednisolon- als auch im Doxycyclin-Arm verstarben jeweils 9 Patienten. Der Karnofsky Score, die Anzahl der Nebenwirkungen innerhalb von 52 Wochen und der Therapieerfolg sowie die Anzahl an Blasen zu späteren Studienvisiten sind den Tabellen 9 bis 11 zu entnehmen.

**Tabelle 9: Karnofsky Score vor Therapiebeginn**

Behandlungsarm Karnofsky Score	Doxycyclin	Prednisolon	Gesamt
0	0	0	0
10	0	0	0
20	0	0	0
30	3	1	4
40	9	5	14
50	8	8	16
60	12	10	22
70	8	6	14
80	19	11	30
90	15	15	30
100	1	2	3

0: Tod; 10: Moribund. Unaufhaltsamer körperlicher Verfall; 20: Schwerkrank. Intensive medizinische Maßnahme erforderlich; 30: Schwerbehindert. Hospitalisation erforderlich; 40: Behindert. Qualifizierte Hilfe benötigt; 50: Hilfe und medizinische Versorgung wird oft in Anspruch genommen; 60: Einige Hilfestellung nötig, selbstständig in den meisten Bereichen; 70: Selbstversorgung. Normale Aktivität oder Arbeit nicht möglich; 80: Normale Aktivität mit Anstrengung möglich. Deutliche Symptome; 90: Fähig zu normaler Aktivität, kaum oder geringe Symptome; 100: Keine Beschwerden, keine Zeichen der Krankheit.

**Tabelle 10: Anzahl der mindestens moderaten Nebenwirkungen innerhalb von 52 Wochen**

Behandlungsarm	Doxycyclin	Prednisolon	Gesamt
<b>Nebenwirkungen</b>			
0	31	21	52
1	19	12	31
2	7	13	20
>2	18	12	30

**Tabelle 11.1: Therapieerfolg nach 6 Wochen**

Behandlungsarm	Doxycyclin	Prednisolon	Gesamt
<b>Behandlungserfolg</b>			
ja	49	42	91
nein	16	6	22
unbekannt	10	10	20

Behandlungserfolg: ja:  $\leq 3$  Blasen in Woche 6; nein:  $> 3$  Blasen in Woche 6.

**Tabelle 11.2: Blasenanzahl in Woche 13**

Behandlungsarm	Doxycyclin	Prednisolon	Gesamt
<b>Blasenanzahl</b>			
$\leq 3$ Blasen	52	43	95
$> 3$ Blasen	8	4	12
unbekannt	15	11	26

**Tabelle 11.3: Blasenanzahl in Woche 26**

Behandlungsarm	Doxycyclin	Prednisolon	Gesamt
<b>Blasenanzahl</b>			
$\leq 3$ Blasen	48	40	88
$> 3$ Blasen	5	1	6
unbekannt	22	17	39

**Tabelle 11.4: Blasenanzahl in Woche 39**

Behandlungsarm	Doxycyclin	Prednisolon	Gesamt
<b>Blasenanzahl</b>			
$\leq 3$ Blasen	51	34	85
$> 3$ Blasen	0	3	3
unbekannt	24	21	45

**Tabelle 11.5: Blasenanzahl in Woche 52**

Behandlungsarm	Doxycyclin	Prednisolon	Gesamt
Blasenanzahl			
≤3 Blasen	45	37	82
>3 Blasen	3	1	4
unbekannt	27	20	47

## 4.7 Korrelationsanalysen

1. *Gibt es einen Zusammenhang zwischen der initialen Höhe der Autoantikörperspiegel und der Anzahl der Blasen vor Therapiebeginn?*

Die Erkrankungsschwere (Anzahl der Blasen) zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses korreliert positiv mit der Höhe der BP180 NC16A IgG Werte ( $p=0,0006$ ), nicht aber mit BP230 IgG ( $p=0,2591$ ), BP180 NC16A IgE ( $p=0,0695$ ) sowie der Höhe des Gesamt IgE ( $p=0,1050$ ) (Tab. 12).

**Tabelle 12: Beziehung zwischen Erkrankungsschwere vor Therapiebeginn und der Höhe der Autoantikörperspiegel und des Gesamt IgE**

Erkrankungs- schwere	BP180 IgG		BP180 IgE		BP230 IgG		Gesamt IgE	
	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch
mild	28	11	29	6	15	24	27	8
moderat	31	26	32	24	25	32	39	17
schwer	12	25	23	14	19	18	22	15
<b>p</b>	0,0006		0,0695		0,2591		0,1050	

Mild: <10 Blasen; moderat: 10-30 Blasen; schwer: >30 Blasen.

2. *Gibt es einen Zusammenhang zwischen der initialen Höhe der Autoantikörperspiegel und dem Karnofsky Score?*

Patienten mit niedrigem Karnofsky Score haben signifikant höhere BP180 NC16A IgG ( $p=0,00008$ ) und BP230 IgG ( $p=0,0022$ ) Werte. Die BP180 NC16A IgE Antikörperspiegel ( $p=0,9776$ ) sowie die Höhe des Gesamt IgE ( $p=0,4726$ ) unterscheiden sich dagegen nicht signifikant (Tab. 13).

**Tabelle 13: Beziehung zwischen Karnofsky Score vor Therapiebeginn und der Höhe der Autoantikörperspiegel und des Gesamt IgE**

Karnofsky Score	BP180 IgG		BP180 IgE		BP230 IgG		Gesamt IgE	
	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch
<b>n</b>	71	62	84	44	59	74	88	40
<b>Median</b>	80	60	70	70	80	60	80	70
<b>Q1; Q3</b>	60; 90	50; 80	60; 80	50; 90	60; 90	50; 80	50; 90	60; 80
<b>Wertebereich</b>	30; 100	30; 90	30; 100	30; 100	30; 100	30; 100	30; 100	40; 90
<b>p</b>	0,00008		0,9776		0,0022		0,4726	

Q1: unteres 25% Quantil; Q3: oberes 25% Quantil.

*3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Höhe der Autoantikörperspiegel vor Therapiebeginn und dem klinischen Outcome?*

Es gibt keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Höhe der Autoantikörperspiegel gegen BP180 NC16A und BP230 sowie der Höhe des Gesamt IgE vor Therapiebeginn und dem klinischen Ansprechen, also der Anzahl der Blasen nach 6, 13, 26, 39 und 52 Wochen. Es wurden zudem keine Unterschiede zwischen den beiden Therapiearmen gefunden (Tab. 14).

**Tabelle 14: Beziehung zwischen Krankheitskontrolle\* und der Höhe der Autoantikörperspiegel und des Gesamt IgE**

Krankheitskontrolle	Woche	BP180 IgG		BP180 IgE		BP230 IgG		Gesamt IgE	
		niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch
<b>6</b>	<b>ja</b>	50	41	60	28	42	49	62	26
	<b>nein</b>	10	12	13	8	5	17	13	8
	<b>p</b>	0,4715		0,3230		0,0500		0,4316	
<b>13</b>	<b>ja</b>	54	41	62	30	42	53	65	27
	<b>nein</b>	6	6	8	3	4	8	7	4
	<b>p</b>	0,6879		0,8116		0,4533		0,6292	
<b>26</b>	<b>ja</b>	51	37	60	26	35	53	59	27
	<b>nein</b>	3	3	4	2	4	2	5	1
	<b>p</b>	0,8130		0,6628		0,2541		0,4830	

<b>39</b>	<b>ja</b>	45	40	60	23	36	49	58	25
	<b>nein</b>	3	0	1	2	2	1	3	0
	<b>p</b>	0,9960		0,3580		0,3580		0,9970	
<b>52</b>	<b>ja</b>	45	37	56	23	36	46	56	23
	<b>nein</b>	3	1	3	1	2	2	4	0
	<b>p</b>	0,4055		0,9949		0,8624		0,9939	

\*≤3 Blasen/Erosionen.

#### 4. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Höhe der Autoantikörperspiegel und der Anzahl an unerwünschten Ereignissen?

Patienten mit höheren Gesamt IgE Werten schienen weniger unerwünschte Ereignisse innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums von 52 Wochen zu entwickeln ( $p=0,0353$ ). Mit der Höhe der BP180NC16A IgG ( $p=0,6805$ ) und IgE ( $p=0,7423$ ) Werte sowie der BP230 IgG Werte ( $p=0,1222$ ) ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen (Tab. 15).

**Tabelle 15: Beziehung zwischen Anzahl der Nebenwirkungen und der Höhe der Autoantikörperspiegel und des Gesamt IgE**

<b>NW</b>	<b>BP180 IgG</b>		<b>BP180 IgE</b>		<b>BP230 IgG</b>		<b>Gesamt IgE</b>	
	<b>niedrig</b>	<b>hoch</b>	<b>niedrig</b>	<b>hoch</b>	<b>niedrig</b>	<b>hoch</b>	<b>niedrig</b>	<b>hoch</b>
<b>0</b>	15	5	14	5	7	13	11	8
<b>1</b>	7	14	14	7	9	12	16	5
<b>2</b>	10	6	12	4	7	9	11	5
<b>&gt;2</b>	11	9	15	5	12	8	18	2
<b>p</b>	0,6805		0,7423		0,1222		0,0353	
<b>Infektionen</b>								
<b>0</b>	46	38	55	26	31	53	52	29
<b>1</b>	15	13	18	9	15	13	22	5
<b>2</b>	2	2	2	2	1	3	4	0
<b>p</b>	0,8112		0,8956		0,2407		0,0398	
<b>Gastro-intestinal</b>								
<b>0</b>	52	48	62	34	39	61	65	31
<b>1</b>	9	4	10	3	7	6	11	2
<b>&gt;1</b>	2	1	3	0	1	2	2	1
<b>p</b>	0,1907		0,2668		0,4171		0,3183	

<b>Steroid.</b>								
<b>0</b>	29	18	29	15	16	31	25	19
<b>1</b>	12	18	19	10	13	17	24	5
<b>2</b>	13	9	16	6	10	12	16	6
<b>&gt;2</b>	9	8	11	6	8	9	13	4
<b>p</b>	0,4286		0,5061		0,2765		0,0543	

NW: Anzahl der mindestens moderaten Nebenwirkungen innerhalb von 52 Wochen; Infektionen: Anzahl der mindestens moderaten Infektionen; Gastro-intestinal: Anzahl der mindestens moderaten gastro-intestinalen Nebenwirkungen; Steroid.: Anzahl der mindestens moderaten corticosteroid-assoziierten Nebenwirkungen.

*5. Haben Patienten, die während der Nachbeobachtungszeit verstarben, höhere Autoantikörperspiegel zu Therapiebeginn?*

Die Patienten, die innerhalb der Nachbeobachtungszeit von 52 Wochen verstarben, hatten signifikant höhere BP180 NC16A IgG ( $p=0,0212$ ) Spiegel als jene, die nicht verstarben. In der Höhe der BP230 IgG ( $p=0,6121$ ), BP180 IgE ( $p=0,1618$ ) Werte sowie des Gesamt IgE ( $p=0,0705$ ) ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen (Tab. 16).

**Tabelle 16: Beziehung zwischen 1-Jahres-Mortalität und der Höhe der Autoantikörperspiegel und des Gesamt IgE**

<b>1-Jahres-Mortalität</b>	<b>BP180 IgG</b>		<b>BP180 IgE</b>		<b>BP230 IgG</b>		<b>Gesamt IgE</b>	
	<b>niedrig</b>	<b>hoch</b>	<b>niedrig</b>	<b>hoch</b>	<b>niedrig</b>	<b>hoch</b>	<b>niedrig</b>	<b>hoch</b>
<b>verstorben</b>	5	13	9	9	7	11	9	9
<b>überlebt</b>	66	49	75	35	52	63	79	31
<b>p</b>	0,0212		0,1618		0,6121		0,0705	

*6. Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Alter und der Höhe der Autoantikörperspiegel zu Therapiebeginn?*

Ältere Patienten wiesen häufiger Anti-BP230 IgG Antikörper auf ( $p=0,0160$ ). In der Höhe der BP180 NC16A IgG ( $p=0,1996$ ) und IgE Spiegel ( $p=0,0836$ ) sowie des Gesamt IgE ( $p=0,2932$ ) ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen (Tab. 17).

**Tabelle 17: Beziehung zwischen Alter und der Höhe der Autoantikörperspiegel und des Gesamt IgE**

Alter	BP180 IgG		BP180 IgE		BP230 IgG		Gesamt IgE	
	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch
<b>n</b>	71	62	84	44	59	74	88	40
<b>Median</b>	78.4	81.2	81.2	75.0	77.2	81.2	79.1	81.5
<b>Q1; Q3</b>	70.8; 85.0	72.7; 86.0	73.8; 87.2	70.9; 84.7	70.1; 83.0	73.5; 87.5	71.1; 85.5	73.7; 86.8
<b>Wertebereich</b>	42.0; 97.7	40.7; 98.7	40.7; 98.7	52.5; 93.2	40.7; 92.6	52.5; 98.7	40.7; 98.7	59.5; 97.7
<b>p</b>	0,1996		0,0836		0,0160		0,2932	

Q1: unteres 25% Quantil; Q3: oberes 25% Quantil.

*7. Haben Patienten, die ein Rezidiv hatten, höhere Autoantikörperspiegel zu Therapiebeginn?*

Patienten mit Rezidiv hatten keine höheren BP180 NC16A IgG ( $p=0,2229$ ) und IgE ( $p=0,8547$ ), BP230 IgG ( $p=0,0696$ ) sowie Gesamt IgE ( $p=0,0694$ ) Autoantikörperspiegel zu Therapiebeginn als Patienten ohne Rezidiv (Tab.18).

**Tabelle 18: Beziehung zwischen Rezidiv und der Höhe der Autoantikörperspiegel und des Gesamt IgE**

Rezidiv	BP180 IgG		BP180 IgE		BP230 IgG		Gesamt IgE	
	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch
<b>ja</b>	10	5	10	4	10	5	13	1
<b>nein</b>	61	57	74	40	49	69	75	39
<b>p</b>	0,2229		0,8547		0,0696		0,0694	

## 5. Diskussion

Das bullöse Pemphigoid (BP) ist die häufigste blasenbildende Autoimmundermatose (146). BP Patienten bilden Autoantikörper gegen die hemidesmosomalen Strukturproteine BP180 und BP230 (142). Die Autoantikörper lassen sich mittels direkter Immunfluoreszenz einer periläsionalen Hautbiopsie entlang der Basalmembran nachweisen (142). Zusätzlich kann man zirkulierende Autoantikörper in der indirekten Immunfluoreszenz auf Affenösophagus und humaner Spalthaut sowie spezifische Antikörper gegen BP180 und BP230 mittels ELISA und Immunoblot detektieren (146). Die größtenteils älteren Patienten leiden häufig längere Zeit unter starkem Juckreiz bis es zur Bildung von prallen Blasen am gesamten Integument kommt (146). Therapeutisch kommen hauptsächlich topische und systemische Glukokortikoide zum Einsatz (145). Die Anwendung von Lokalthapeutika bei älteren ambulanten Patienten ist jedoch oftmals schwer umsetzbar. Die alternative systemische Gabe von Glukokortikoiden führt häufig zu schwerwiegenden Nebenwirkungen wie Infektionen, Diabetes und Frakturen. In der Vergangenheit machte man sich auch die antiinflammatorische Wirkung von Antibiotika, unter anderem Tetracyclinen, in der Therapie des BP zu Nutze (19). Bisher gab es allerdings erst eine klinische Studie mit lediglich 20 Probanden zur Wirksamkeit von Tetracyclinen bei BP Patienten (53). In der aktuellen multizentrischen randomisierten BLISTER Studie wurde daher die initiale Therapie mit Doxycyclin 200 mg/Tag mit einer Therapie mit Prednisolon 0,5 mg/kg KG/Tag in Hinblick auf das Ansprechen und die Nebenwirkungen bei BP Patienten verglichen (19). Zwar erwarteten die Initiatoren der Studie nicht, dass Doxycyclin besser wirke als Prednisolon, jedoch bei zufriedenstellender Wirksamkeit zu deutlich weniger Nebenwirkungen führe. Diese Hypothese konnte bestätigt werden. In der Prednisolon-Gruppe wurde bei 91% der Patienten eine Krankheitskontrolle nach 6 Wochen erreicht im Vergleich zu 74% in der Doxycyclin-Gruppe (Unterschied 19%). Im Gegensatz zu 37% der Patienten, die Prednisolon erhielten, entwickelten lediglich 18,5% der Patienten im Doxycyclin-Arm Grad 3, 4 und 5 Nebenwirkungen innerhalb von 52 Wochen (Unterschied 19%,  $p=0,001$ ).

Die Kohorte der BLISTER Studie stellt eine der weltweit größten BP Kohorten dar und ist deshalb ideal geeignet, um den Zusammenhang zwischen Autoantikörperspiegeln und klinischen Merkmalen zu untersuchen. Wie von Grantham et al. in ihrem Editorial zur BLISTER Studie angeregt wurde, versuchten wir einen Serumbiomarker für das Therapieansprechen zu finden (66). In dieser Arbeit wurden dafür Serumproben von 143 Patienten der BLISTER Studie auf Autoantikörper untersucht. Hierzu kamen verschiedene Testsysteme zum Einsatz: Zwei kommerziell erhältliche ELISA zur Bestimmung der Anti-BP180 NC16A und Anti-BP230 IgG Spiegel, ein ELISA zur Bestimmung der IgE-Reaktivität gegen BP180 NC16A, Immunoblots mit verschiedenen Substraten zur Detektion von Antikörpern gegen Laminin 332, p200/Laminin  $\gamma$ 1, Typ VII Kollagen, BP230 und BP180 NC16A (IgG), klassische IIF auf humaner Spalthaut und Affenösophagus sowie ein BIOCHIP Mosaik®, das ebenfalls auf dem Prinzip der IIF basiert. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die in der BLISTER Studie erhobenen klinischen Daten ausgewertet und auf Zusammenhänge mit den Antikörperspiegeln untersucht. Zu den klinischen Daten gehören: Krankheitsschwere und Karnofsky Score zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses sowie Anzahl der Blasen und Schwere und Anzahl der aufgetretenen Nebenwirkungen zu den Zeitpunkten 3, 6, 13, 26, 39 und 52 Wochen.

Das mittlere Alter von 77 Jahren in unserer BP Kohorte ist repräsentativ für die meisten anderen BP Kohorten mit einem mittleren Alter von 74 bis 83 Jahren (143). In China scheint das mittlere Erkrankungsalter mit 64 Jahren etwas niedriger zu liegen (138). Bei Patienten unter 50 Jahren kommt es selten zur Erkrankung (143). Insgesamt wurden nur ca. 80 Fälle von Patienten im Kindes- und Jungendalter berichtet (3, 122, 167). Die Hälfte dieser Patienten war bei Diagnosestellung unter einem Jahr alt (167). Eine Assoziation des kindlichen BP mit Impfungen wird diskutiert (36). Da die Inzidenz des BP mit zunehmendem Alter stark ansteigt, ist durch die alternde Bevölkerung in Europa eine Zunahme der BP Erkrankungen in den nächsten Jahrzehnten zu erwarten (143). In unserer Kohorte konnte erstmals nachgewiesen werden, dass ältere Patienten häufiger Anti-BP230 Antikörper aufweisen. Dies könnte darauf hinweisen, dass es bei älteren Patienten leichter zum Epitope Spreading von BP180 zu BP230 kommt, was eventuell an der immunologischen Seneszenz oder der gealterten Hautstruktur an sich liegen

könnte. Beim Epitope Spreading kommt es durch einen Gewebeschaden dazu, dass Strukturen freigelegt werden, die zuvor unzugänglich für das Immunsystem waren. Dies führt zu einer Immunantwort mit Antikörperbildung gegen zusätzliche Epitope auf demselben Molekül oder auf einem anderen Antigen (20, 21, 41).

Die Geschlechterverteilung in unserer Kohorte war mit 48% Frauen und 52% Männern fast ausgeglichen. Insgesamt scheint es beim BP keine deutliche Geschlechterprädominanz zu geben. Studien zeigten zwar mit 52-60% einen etwas höheren Frauenanteil (86, 98, 124, 135), nach Altersadjustierung war die Inzidenz allerdings höher bei Männern (86, 88).

In 95% Prozent unserer BP Kohorte ließen sich in der IIF zirkulierende IgG Antikörper, die an die epidermale (Blasendach) Seite des artifiziellen Spalts der humanen Spalthaut binden, nachweisen. Dies ist vereinbar mit anderen BP Kollektiven mit einem Nachweis von Autoantikörpern bei 70 – 95% der Patienten (58, 60, 92, 109, 132). Im Einklang mit bisherigen Studien, in denen 75-90% der Patienten IgG Antikörper gegen BP180 NC16A aufwiesen (62, 93, 112, 136, 155, 161, 179), wurden in der hier untersuchten BP Kohorte bei 91% der Patienten im ELISA Antikörper gegen das Hauptzielantigen des BP detektiert. Entsprechend früherer Studien mit einem Nachweis von IgG Antikörper gegen BP230 bei 50-70% der BP Patienten (12, 22, 96, 132, 158, 160, 173), konnten wir in 56% der untersuchten Patienten IgG Antikörper gegen BP230 im ELISA detektieren. Eine frühere Studie zeigte, dass die Reaktivität in der IIF, sowohl auf Affenösophagus als auch auf humaner Spalthaut, hauptsächlich durch Anti-BP230 Antikörpern vermittelt wird (125). Die pathogenetische Relevanz der Anti-BP230 Antikörper dagegen ist bisher noch nicht hinreichend geklärt. Bisherige Versuche, diese im Mausmodell nachzuweisen, waren nicht eindeutig (52).

Im Jahr 2000 wurde erstmals berichtet, dass die Serumspiegel von Anti-BP180 NC16A IgG mit der Krankheitsaktivität korrelieren (137). Diese Beobachtung konnte später noch in vielen Studien bestätigt werden (2, 17, 70, 93, 102, 161, 166). Um die Plausibilität unserer Daten zu überprüfen, untersuchten wir zu Beginn ebenfalls den Zusammenhang der Anti-BP180 NC16A Autoantikörperspiegel mit der Krankheitsschwere bei Studienbeginn. Wie erwartet,

zeigten schwerer betroffene Patienten höhere Anti-BP180 NC16A Autoantikörperspiegel. Im Gegensatz hierzu korrelierte die Höhe der Anti-BP230 IgG Antikörperspiegel, wie auch zuvor publiziert, in unserer Kohorte nicht mit der Krankheitsaktivität (102). Die Einteilung der Patienten in die verschiedenen Gruppen erfolgte nach Anzahl der vorhandenen Blasen in „mild“ (<10 Blasen), „moderat“ (10-30 Blasen) und „schwer“ (>30 Blasen). Es ist anzumerken, dass diese Einteilung relativ grob ist. 2012 wurde der Bullous Pemphigoid Disease Area Index (BPDAI) veröffentlicht, ein Score zur Beurteilung der Krankheitsaktivität, bei dem separat das Ausmaß bullöser und erythematöser Hautläsionen an betroffenen Hautarealen sowie Schleimhautläsionen und der Pruritus bewertet werden (118). Dieser Score war jedoch bei der Ausarbeitung des BLISTER Studienprotokolls 2007/2008 noch nicht verfügbar. Die in der BLISTER Studie verwendete Einteilung der Krankheitsschwere diente unter anderem zur Randomisierung in die Therapiearme. Hier ist es sicherlich sinnvoll, eher grob einzuteilen. Zur Beurteilung und Dokumentation der Krankheitsaktivität ist eine genauere und lineare Einteilung, wie sie beim BPDAI vorgenommen wird, von größerem Nutzen.

Ein in der Durchführung simples Verfahren zur Detektion der verschiedenen Zielantigene der blasenbildenden Autoimmundermatosen ist das kommerziell erhältliche BIOCHIP Mosaik®. Hierbei werden gleichzeitig 6 Reaktionsfelder inkubiert: humane Spalthaut, Affenösophagus, BP230, Desmoglein 1 und 3 exprimierende HEK293 Zellen sowie rekombinantes BP180 NC16A (134, 159, 164, 176). In 47 Fällen der hier untersuchten Kohorte entsprach das Ergebnis mindestens eines der BIOCHIP Felder nicht den Ergebnissen der konventionellen Testverfahren. Die häufigste Abweichung zeigte sich zwischen dem Ergebnis des BIOCHIP im Feld mit der humanen Spalthaut und dem Ergebnis der konventionell durchgeführten IIF auf humaner Spalthaut, welche in 21 Fällen trotz negativem BIOCHIP Feld positiv war. Dies könnte möglicherweise an der geringeren Größe der Spalthaut im BIOCHIP Feld liegen. In 17 Fällen zeigte sich bei negativem BIOCHIP Feld zum Nachweis von Antikörpern gegen BP230 im ELISA ein positives Ergebnis. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Auswertung des BIOCHIP Mosaiks® beobachterabhängig ist und in manchen Fällen eventuell falsch negativ interpretiert wurde. Andererseits könnte es auch zu falsch positiven ELISA Ergebnissen gekommen sein, die Spezifität des BP230 ELISA beträgt

97,6% (12). In den allermeisten Fällen der inkongruenten Seren (80,6%) wäre allerdings trotz dessen die Diagnose einer Pemphigoiderkrankung gestellt worden, da mindestens ein anderes Feld im BIOCHIP entsprechende Ergebnisse zeigte. Zum Beispiel wiesen die im BIOCHIP negativen BP230 Seren sowohl eine Reaktivität für BP180 sowie Antikörper-Ablagerungen am Blasendach humaner Spalthaut im BIOCHIP auf. In nur 5% aller untersuchten Seren war das BIOCHIP Mosaik® komplett negativ, obwohl in mindestens einem der entsprechenden konventionellen Testverfahren ein positives Ergebnis nachgewiesen wurde. In einer großen prospektiven Studie zur serologischen Diagnostik bullöser Autoimmundermatosen wurde in 94% der Seren im BIOCHIP und bei konventioneller Diagnostik die gleiche Diagnose gestellt (164). Passend zu unserer Beobachtung zeigten in dieser Studie lediglich 3,7% aller untersuchten Seren keine Reaktivität im BIOCHIP, während durch konventionelle Testverfahren die Diagnose einer bullösen Autoimmundermatose gestellt wurde (164). Unter Betrachtung aller aufgeführten Aspekte stellt das BIOCHIP Mosaik® als Suchtest bei Verdacht auf eine blasenbildende Autoimmundermatose ein gutes und einfach durchführbares Verfahren dar. Es ist allerdings anzumerken, dass hier nur Antikörper des IgG Isotyps nachgewiesen werden, nicht jedoch IgA oder IgE Reaktivität.

Neben IgG Autoantikörpern weisen BP Patienten auch IgE Autoantikörper auf (43). Der Anteil der Seren mit IgE-Reaktivität gegen BP180 in unserer Kohorte war mit 36% etwas geringer im Vergleich zu 39%, 42% und 58% in drei kürzlich erschienen Studien (70, 166). Das Auftreten von IgE Anti-BP180 NC16A Antikörpern wurde in mehreren Studien mit einer schwereren Form der Erkrankung in Verbindung gebracht (37). Diese Annahme konnte in der Kohorte der BLISTER Studie nicht bestätigt werden. Zusätzlich gibt es Hinweise auf eine Korrelation der Anti-BP180 NC16A IgE Werte mit der Krankheitsaktivität in individuellen BP Patienten (166). Hierzu konnten in dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden, da lediglich zu einem Zeitpunkt Serum eingesandt wurde. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind übereinstimmend mit denen von Bing et al. (11), auch hier wurde kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Autoantikörperspiegel von BP180 NC16A IgE und der Krankheitsaktivität im Frühstadium gefunden. 42% der untersuchten Seren wiesen zudem erhöhte

Gesamt IgE Werte (>100 U/ml) auf. Dieser Prozentsatz ist wesentlich geringer im Vergleich zu den bisher veröffentlichten Werten von 70-85% (165). In der hier durchgeführten Studie gab es keinen Zusammenhang zwischen der Höhe der Gesamt IgE Werte und dem Schweregrad der Erkrankung. Van Beek et al. stellten die Hypothese auf, dass das Auftreten von Anti-BP180 NC16A IgE Antikörpern mit einem bestimmten klinischen Phänotypen assoziiert ist. Sie vermuteten, dass diese Patienten eher urtikarielle Läsionen und Erytheme statt die klassischen prallen Blasen aufweisen (166). Der Hintergrund dieser Hypothese war zum einen, dass Anti-BP180 NC16A IgE Antikörper im Mausmodell zu einem pruriginösen Erythem und lediglich mikroskopischer Blasenbildung führte (49, 183). Zudem wird vermutet, dass die beim BP nachgewiesene Mastzellaktivierung (24), entsprechend der Pathogenese bei IgE-vermittelten Typ-I-Allergien, zur Ausbildung urtikarieller Läsionen führt. Bei der atopischen Dermatitis, ebenso wie das BP assoziiert mit erhöhten Gesamt IgE Werten und einer Eosinophilie, kommt es gleichfalls zu erheblichem Juckreiz (92, 168). In der Studie von van Beek et al. bestätigte sich die erwartete Assoziation zwischen dem Auftreten von Anti-BP180 NC16A IgE Antikörpern mit urtikariellen Läsionen und Erythemen jedoch nicht. Jedoch zeigte sich eine Korrelation der Gesamt IgE Werte mit dem Umfang der urtikariellen/erythematösen Läsionen sowie der Intensität des Juckreizes (166). Somit scheint die Ausbildung von urtikariellen Läsionen und Erythemen eher durch erhöhte Gesamt IgE Spiegel als durch spezifische IgE Antikörpern gegen BP180 getriggert zu werden. Da in der BLISTER Studie keine Angaben über urtikarielle/erythematöse Läsionen und den Juckreiz gemacht wurden, konnten diese Aussagen in unserer Studie nicht überprüft werden. Engineer et al. wiesen bereits 2001 mittels Immunoblotting IgE Antikörper gegen BP230 sowohl im Serum als auch in Blasenflüssigkeit von 6 von 6 BP Patienten nach (48). Diese Patienten zeigten zusätzlich sowohl im Serum als auch in Hautproben eine Eosinophilie (48). Spätere Studien zeigten in 72% von 67 Seren sowie in 50% von 32 Seren IgE Reaktivität gegen BP230 mittels ELISA (51, 79). Da derzeit kein kommerziell erhältlicher ELISA zur Detektion von Anti-BP230 IgE zur Verfügung steht und sich ein inhouse ELISA unseres Instituts gegenwertig in der Etablierung befindet, wurden in dieser Arbeit keine BP230 IgE Antikörper bestimmt.

Eine wichtige Rolle bei der Wahl der medikamentösen Therapie des BP spielen potentielle Nebenwirkungen. Die bis zu sechsfach erhöhte Mortalität bei BP Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung ist zumindest zum Teil auf die medikamentöse Therapie mit oralen Glukokortikoiden zurückzuführen (86). Die systemische Therapie mit Prednisolon kann zu erheblichen Nebenwirkungen wie Infektanfälligkeit, Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Nebenniereninsuffizienz, Glaukom, Katarakt, Osteoporose und Thrombosen führen. Aus diesem Grund war das Auftreten von Nebenwirkungen neben der Wirksamkeit das zweite Zielkriterium der BLISTER Studie (18). Nach den Kriterien der Weltgesundheitsorganisation lassen sich Nebenwirkungen in 5 Schweregrade einteilen: Grad 1:mild, Grad 2: moderat, Grad 3: schwer, Grad 4: lebensbedrohlich, Grad 5: tödlich. In der Auswertung der BLISTER Studie wurde die Anzahl der Patienten mit mindestens moderaten Nebenwirkungen gezählt. Dies waren 36,6% der Patienten im Prednisolon-Arm sowie 18,5% in der Doxycyclin-Gruppe (19). Um auch subtilere Effekte zu detektieren, schlossen wir in der Auswertung des Zusammenhangs der Anzahl der Nebenwirkungen und der serologischen Ergebnisse zusätzlich die Anzahl der moderaten Nebenwirkungen mit ein. In unserer Kohorte schienen Patienten mit höheren Gesamt IgE Werten weniger Nebenwirkungen zu entwickeln. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Zusammenhang auf den aufgetretenen Infektionen beruht, während kein Zusammenhang zu den gastrointestinalen und nicht-infektiösen steroidassoziierten Nebenwirkungen bestand. Die Rationale hinter dem beobachteten Schutz durch hohe Gesamt IgE Werte ist unklar und sollte in weiteren Studien erneut beurteilt werden.

Bei den Patienten der BLISTER Studie wurde zudem der Karnofsky Score vor Therapieeinleitung bestimmt. Bei diesem Score, auch Karnofsky Performance Status Scale genannt, handelt es sich um eine Skala, mit der vor allem bei geriatrischen Patienten der gesundheitliche und funktionelle Status erhoben und Hochrisikopatienten identifiziert werden können (33). Sie reicht von 0 (Tod) bis 100 (keine Beschwerden, keine Zeichen der Krankheit). Höhere IgG Autoantikörperspiegel gegen BP180 NC16A und BP230 waren in unserer Studie mit einem niedrigeren Karnofsky Score assoziiert. Dies bedeutet, dass Patienten mit größerer Einschränkung der Aktivität und Selbstversorgung höhere

Autoantikörperwerte aufweisen. Der Karnofsky Score der in dieser Studie untersuchten Patienten lag im Mittel bei  $69 \pm 18$ . Dies ist vergleichbar mit zwei anderen Studien mit einem mittleren Score von  $64 \pm 24$  und  $58 \pm 17$  (84, 126). In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass der Karnofsky Score bei BP Patienten mit neurologischen Erkrankungen, Demenz und Infektionen niedriger ist (26, 29, 126). Zudem wiesen BP Patienten mit einer kurzen Zeitspanne zwischen dem ersten Auftreten von Symptomen und der Diagnosestellung einen niedrigeren Karnofsky Score als Patienten mit einer längeren Dauer bis zur Diagnosestellung auf (78). Joly et al. stellten fest, dass ein Karnofsky Score  $<40$  einen Risikofaktor für erhöhte Mortalität bei BP Patienten darstellt (84).

Wie bereits erwähnt ist die Mortalität unter BP Patienten bis zu sechsfach erhöht im Vergleich zur Normalbevölkerung (86). Die 1-Jahres-Mortalität in unserer Kohorte betrug 13,5%. In der BLISTER Studie mit allen 253 Patienten war sie nahezu identisch mit 13,4% (169). In bisherigen Studien lag sie mit 11 bis 41% hingegen zum Teil wesentlich höher (16, 28, 31, 55, 86, 98, 131). Die Gründe für diese diskrepanten Ergebnisse wurden kontrovers diskutiert. In den Studien von Joly et al. und Roujeau et al. wurden mit 38 und 41% die höchsten 1-Jahres-Mortalitätsraten detektiert (86, 131). Die in der Schweiz und den USA wesentlich niedrigeren 1-Jahres-Mortalitätsraten von 11, 21 und 23% lassen sich möglicherweise durch das geringere Durchschnittsalter der untersuchten BP Kohorten erklären (28, 31, 124). Während das mittlere Alter bei Colbert et al., Parker et al. und Cortes et al. bei 77, 75 und 76 Jahren lag, betrug es in der Studie von Joly et al. 83 Jahre. Eine weitere Erklärung für die niedrigere Mortalitätsrate bei Cortes et al. könnte die hohe Anzahl an Patienten sein, die der Nachbeobachtung entgingen (18% im Vergleich zu 1% bei Joly et al.). Als möglicher Grund für die erhöhte Mortalität in Europa im Gegensatz zu den USA wurde auch die längere und häufigere Hospitalisierung der BP Patienten diskutiert. So werden in Europa fast alle Patienten bei Erstdiagnose stationär behandelt (28). Die Ergebnisse einer spanischen Studie sprechen gegen diese Hypothese, da der Tod nicht im zeitlichen Zusammenhang mit dem Krankenhausaufenthalt der Patienten stand (59). Während bei Joly et al. und Cortes et al. die Mortalität bei BP Patienten im Vergleich zu alters- und geschlechtsgleichen Personen der Normalbevölkerung sechs- bzw. dreifach erhöht war, fanden Parker et al. keinen

Unterschied zwischen der altersspezifischen Mortalität in der Normalbevölkerung und der Mortalität bei BP Patienten. Interessanterweise zeigten die Patienten unserer Kohorte, die innerhalb der Nachbeobachtungszeit von einem Jahr verstarben (n=18), höhere IgG Autoantikörperspiegel gegen BP180 NC16A. In der Vergangenheit konnte das Auftreten von Anti-BP180 IgG Autoantikörpern bei BP Patienten mit einer erhöhten Mortalität in Zusammenhang gebracht werden (9). In einer prospektiven deutschen Studie wurde gezeigt, dass hohes Alter (>80 Jahre), Einnahme einer großen Dosis von Glukokortikoiden (>37 mg/Tag), ein niedriges Serumalbumin (<3,6 mm/h) und eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (>30mm/h) mit erhöhter Mortalität assoziiert sind (135). 2011 wies eine Schweizer Studie nach, dass neurologische Erkrankungen einen negativen prädiktiven Faktor für die Sterblichkeit beim BP darstellen (31). Die Einnahme von vielen verschiedenen Medikamenten und die Diagnose eines Malignoms wurden ebenfalls mit erhöhter Mortalität in Zusammenhang gebracht (55). Auch das weibliche Geschlecht zeigte eine Assoziation zu erhöhter Sterblichkeit (131). In Singapur fand man heraus, dass Parkinson, Herzinsuffizienz und chronische Niereninsuffizienz mit erhöhter Mortalität in Verbindung stehen (16).

In der hier untersuchten Kohorte wurde bei einem Patienten in der IIF auf Affenösophagus IgA-Reaktivität gegen Endomysium nachgewiesen. Daraufhin wurde das Serum im ELISA auf IgA Antikörper gegen Gewebstransglutaminase und Gliadin getestet und zeigte in beiden Tests positive Ergebnisse, so dass die Diagnose einer Dermatitis herpetiformis Duhring gestellt werden konnte. Hierbei handelt es sich um eine subepidermal blasenbildende Autoimmundermatose, die in Verbindung mit der Glutensensitiven Enteropathie (Zöliakie) auftritt (13). Sie ist charakterisiert durch IgA-Ablagerungen in den dermalen Papillen in der direkten Immunfluoreszenz (14). Klinisch kommt es zur Blasenbildung vor allem an den Streckseiten der Extremitäten, der Glutealregion und der Kopfhaut (13). Leitsymptom ist zudem der starke Juckreiz (13). Die Therapie besteht aus einer strikten glutenfreien Diät sowie der Einnahme von Dapson (14).

Im Serum von 9 Patienten ließen sich Antikörper gegen das p200 Protein bzw. Laminin  $\gamma$ 1 nachweisen, so dass hier die Diagnose eines Anti-p200/Laminin  $\gamma$ 1 Pemphigoids gestellt wurde. Diese 9 Seren sowie das Serum des Dermatitis

herpetiformis Duhring Patienten wurden von der weiteren Analyse über Zusammenhänge mit den klinischen Daten ausgeschlossen. Dass in der Kohorte der BLISTER Studie, die die Therapie von BP Patienten untersuchte, auch Patienten sind, die offensichtlich nicht an einem BP litten, lässt sich anhand der Einschlusskriterien der Studie erklären: Zur Diagnosebestätigung bei klinischem Verdacht auf ein BP reichte die direkte oder indirekte Immunfluoreszenz aus. Ein Anti-p200/Laminin  $\gamma$ 1 Pemphigoid lässt sich allerdings in der direkten Immunfluoreszenz oder in der indirekten Immunfluoreszenz auf Affenösophagus nicht von einem BP oder einer anderen Pemphigoid-Erkrankung differenzieren.

Das Anti-p200/Laminin  $\gamma$ 1 Pemphigoid wurde erstmals 1996 beschrieben (23, 178). Es ist charakterisiert durch Autoantikörper gegen ein 200 kDa schweres Protein der dermo-epidermalen Junctionszone (145). Es handelt sich um ein saures, nicht kollagenöses, N-glykosidisch gebundenes Glykoprotein (73, 150). Mittels Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass es in der unteren Lamina lucida außerhalb der Hemidesmosomen lokalisiert ist (23, 46, 152, 178, 181). Im Gegensatz zu Versuchen mit IgG Antikörpern von Patienten mit BP (138) führt die Inkubation mit anti-p200 Pemphigoid IgG nicht zur Freisetzung von IL-8 aus kultivierten humanen Keratinozyten (80). Dies lässt darauf schließen, dass hier ein anderer Mechanismus zur Neutrophilenakkumulation in Hautläsionen führt (63). Wie zuvor für das BP und die Epidermolysis bullosa acquisita gezeigt (57, 151, 153), führt die Inkubation mit Serum von Anti-p200 Pemphigoid Patienten und Leukozyten von gesunden Spendern im ex vivo Modell mit Kryoschnitten humaner Haut zur subepidermalen Spaltbildung (163), wohingegen Laminin  $\gamma$ 1-spezifisches IgG keinen Effekt zeigte (163). Die Klinik des Anti-p200/Laminin  $\gamma$ 1 Pemphigoids ist variabel, in den meisten Fällen ähnelt sie der des bullösen Pemphigoids (42, 90, 171). Sie kann aber auch die Klinik der linearen IgA-Dermatose (42, 119), Dermatitis herpetiformis Duhring (63) oder Pompholyx (42) imitieren. Die meisten Patienten zeigen juckende erythematöse Plaques, pralle Blasen, Bläschen und Erosionen am Stamm und den Extremitäten (42). In ca. 20% der Patienten ist die Mund- und/oder Genitalschleimhaut betroffen (42, 65, 80, 116, 117). Normalerweise heilen die Läsionen ohne Narben- oder Milienbildung ab (42). Die Patienten scheinen jünger zu sein als beim BP (63). In 30% der publizierten Fälle zeigte sich eine Assoziation mit Psoriasis (34, 42). Die Therapie des Anti-

p200/Laminin  $\gamma$ 1 Pemphigoids ist unspezifisch und entspricht weitestgehend der des BPs (42). Der Verlauf allerdings ist häufig benigner im Vergleich zum BP (63). Die Patienten reagieren meist schnell auf die Therapie, in milden Fällen ist die topische Therapie mit Steroiden oft ausreichend (145).

Die Tatsache, dass in der Kohorte der BLISTER Studie auch Patienten mit anderen Pemphigoiderkrankungen inkludiert waren, macht deutlich, wie schwierig die Zuteilung zu den einzelnen Entitäten ist. Oftmals weisen Patienten Antikörper gegen verschiedene Zielantigene der dermo-epidermalen Junktionszone auf. Dass im Verlauf der Erkrankung Antikörper gegen weitere Antigene gebildet werden, ist nicht ungewöhnlich und wird dem oben genannten Epitope Spreading zugeschrieben. Falls ein Patient jedoch bereits bei Diagnosestellung Antikörper gegen mehrere Antigene aufweist, bedarf es der Einzelfallentscheidung, welches Antigen als Hauptantigen betrachtet wird und somit zur Diagnosestellung führt. Da einige der diagnostischen Verfahren (zum Beispiel Immunoblot mit dermalem Extrakt) nur in spezialisierten Zentren verfügbar sind, wird das Zielantigen häufig nicht identifiziert und Patienten fehldiagnostiziert. Auf Grund der zum Teil divergenten Therapie und Prognose der verschiedenen Entitäten sollte immer eine Bestimmung des spezifischen Zielantigens angestrebt werden. Aber auch wenn eindeutig ein BP vorliegt, ist bisher kein Biomarker bekannt, der das Therapieansprechen für etwaige Medikamente vorhersagt. Dadurch können von der Diagnosestellung bis zur Remission einige Wochen vergehen. In dieser Zeit kann es zu Superinfektionen kommen. Auch nosokomiale Infektionen durch lange stationäre Klinikaufenthalte sind mögliche Komplikationen. Bis zu 40% der BP Patienten unter der Therapie mit systemischen Glukokortikoiden entwickeln Infektionen, die zu Krankenhauseinweisung oder Tod führen (103). Das Risiko eine Pneumonie zu entwickeln ist bei BP Patienten dreimal höher als in der Normalbevölkerung (99). Daher war eines der Ziele dieser Studie, einen Biomarker für das Therapieansprechen zu finden. Von den hier untersuchten Parametern ließ sich jedoch zu keinem eine Assoziation mit der Wirksamkeit der verschiedenen Therapien nachweisen. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Patienten, die innerhalb eines Jahres verstarben, höhere IgG Antikörper gegen BP180 und BP230 aufwiesen. Zudem schienen Patienten mit höheren Gesamt IgE Spiegeln weniger Nebenwirkungen zu entwickeln.

Zukünftige Studien sollten die Ergebnisse an einem weiteren Patientenkollektiv verifizieren. Um erfolglose Therapieversuche und die aus der Krankheitsaktivität resultierenden Komplikationen zu minimieren, sollte in nachfolgenden Studien weiterhin nach Serummarkern für das Therapieansprechen gesucht werden. Eine Limitation der Studie ist, dass lediglich zu einem Zeitpunkt (vor Studieneinschluss) Serum verfügbar war und dass nicht alle Patienten der BLISTER Studie zu dieser zusätzlichen Studie eingewilligt haben. Somit lassen sich keine Aussagen über die Serumautoantikörperspiegel im Verlauf der Erkrankung machen. Eine klare Stärke der Studie besteht aus dem multizentrischen prospektiven Design und der hohen Qualität der klinischen Daten.

## 6. Zusammenfassung

Das bullöse Pemphigoid (BP) ist die häufigste blasenbildende Autoimmundermatose. Betroffen sind hauptsächlich Patienten in einem Alter von über 75 Jahren. Das BP ist immunopathologisch charakterisiert durch das Auftreten von Autoantikörpern gegen die hemidesmosomalen Strukturproteine BP180/Typ XVII Kollagen und BP230. Bei der Therapie des BP kommen lokale und systemische Glukokortikoide sowie Dapson, Doxycyclin, Azathioprin und Methotrexat zur Anwendung. In der multizentrischen prospektiven BLISTER (Bullous Pemphigoid Steroids and Tetracyclines) Studie wurde kürzlich bei 253 randomisierten Patienten mit bullösem Pemphigoid Wirkung und Sicherheit einer Therapie mit Doxycyclin 200 mg/d mit einer Behandlung mit Prednisolon 0,5 mg/kg/d ausschleichend verglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Serum von 143 Patienten der BLISTER Studie auf Biomarker untersucht und diese mit den in der Studie gewonnenen klinischen Daten assoziiert. Ziel dieser Arbeit war es, Biomarker in den Patientenseren zu identifizieren, die Aussagen über den zukünftigen Krankheitsverlauf erlauben. Als Suchtest für Autoantikörper gegen die dermo-epidermale Junktionszone wurde zunächst die indirekte Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut und Affenösophagus sowie das ebenfalls auf dem Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz basierende BIOCHIP Mosaik® angewendet, in dem verschiedene Gewebssubstrate und rekombinante Zielantigene zeitgleich untersucht werden können. Zur weiteren Differenzierung der IgG Autoantikörper wurde mittels Immunoblot nach Antikörpern gegen LAD-1, BP180 NC16A, Laminin 332, p200/Laminin  $\gamma$ 1 und Typ VII Kollagen gesucht sowie quantitativ mittels ELISA die Höhe der Antikörper gegen BP180 NC16A und BP230 bestimmt. Zusätzlich wurde das Gesamt IgE und IgE Reaktivität gegen BP180 NC16A bestimmt.

In 126 der 143 untersuchten Seren (88,1%) ließen sich in der indirekten Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut IgG-Ablagerungen an der epidermalen Seite des artifiziellen Spalts nachweisen, 5 zeigten Ablagerungen an der epidermalen und dermalen Seite sowie 2 ausschließlich an der dermalen Seite.

Im ELISA konnte in 121 (84,6%) bzw. 48 (34,8%) Seren IgG bzw. IgE Antikörper gegen BP180 NC16A nachgewiesen werden sowie in 74 (51,7%) IgG Antikörper gegen BP230. Wie erwartet zeigte sich ein Zusammenhang der Krankheitsaktivität der Patienten mit den Spiegeln von Anti-BP180 NC16A IgG ( $p=0,0006$ ), nicht aber mit Anti-BP180 NC16A IgE ( $p=0,0695$ ) und Anti-BP230 IgG ( $p=0,2591$ ). Ein niedriger Karnofsky Score war in der Studie mit höheren IgG Anti-BP180 NC16A ( $p=0,00008$ ) und IgG Anti-BP230 Spiegeln ( $p=0,0022$ ) assoziiert. Weiterhin wiesen ältere Patienten häufiger Anti-BP230 IgG Antikörper auf ( $p=0,0160$ ). Interessanterweise schienen Patienten mit höheren Gesamt IgE Werten weniger unerwünschte Ereignisse ( $p=0,0353$ ) zu entwickeln. Zudem wiesen Patienten mit höherem IgG Antikörperspiegel ( $p=0,0212$ ) gegen BP180 NC16A eine erhöhte 1-Jahres-Mortalität auf. Kein Zusammenhang wurde beobachtet zwischen den initialen Autoantikörperspiegeln und der Zeit bis zur Krankheitskontrolle oder der Ausbildung eines Rezidivs.

Die explorativen Ergebnisse dieser prospektiven multizentrischen Studie sollten an weiteren Patientenkollektiven verifiziert werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die genaue Untersuchung serologischer Biomarker zu Behandlungsbeginn möglicherweise wichtige Rückschlüsse auf den weiteren Krankheitsverlauf wie unerwünschte Ereignisse und Mortalität liefern kann.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Amagai M, Ikeda S, Hashimoto T, Mizuashi M, Fujisawa A, Ihn H, Matsuzaki Y, Ohtsuka M, Fujiwara H, Furuta J, Tago O, Yamagami J, Tanikawa A, Uhara H, Morita A, Nakanishi G, Tani M, Aoyama Y, Makino E, Muto M, Manabe M, Konno T, Murata S, Izaki S, Watanabe H, Yamaguchi Y, Matsukura S, Seishima M, Habe K, Yoshida Y, Kaneko S, Shindo H, Nakajima K, Kanekura T, Takahashi K, Kitajima Y, Hashimoto K. A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci*. 2017;85(2):77-84.
2. Amo Y, Ohkawa T, Tatsuta M, Hamada Y, Fujimura T, Katsuoka K, Hashimoto T. Clinical significance of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci*. 2001;26(1):14-8.
3. Amos B, Deng JS, Flynn K, Suarez S. Bullous pemphigoid in infancy: case report and literature review. *Pediatr Dermatol*. 1998;15(2):108-11.
4. Asbrink E, Hovmark A. Serum IgE levels in patients with bullous pemphigoid and its correlation to the activity of the disease and anti-basement membrane zone antibodies. *Acta Derm Venereol*. 1984;64(3):243-6.
5. Baican A, Baican C, Chiriac G, Chiriac MT, Macovei V, Zillikens D, Ciuce D, Sitaru C. Pemphigus vulgaris is the most common autoimmune bullous disease in Northwestern Romania. *Int J Dermatol*. 2010;49(7):768-74.
6. Bastuji-Garin S, Joly P, Lemordant P, Sparsa A, Bedane C, Delaporte E, Roujeau JC, Bernard P, Guillaume JC, Ingen-Housz-Oro S, Maillard H, Pauwels C, Picard-Dahan C, Dutronc Y, Richard MA. Risk factors for bullous pemphigoid in the elderly: a prospective case-control study. *J Invest Dermatol*. 2011;131(3):637-43.
7. Beissert S, Werfel T, Frieling U, Bohm M, Sticherling M, Stadler R, Zillikens D, Rzyany B, Hunzelmann N, Meurer M, Gollnick H, Ruzicka T, Pillekamp H, Junghans V, Bonsmann G, Luger TA. A comparison of oral methylprednisolone plus azathioprine or mycophenolate mofetil for the treatment of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol*. 2007;143(12):1536-42.
8. Bernard P, Vaillant L, Labeille B, Bedane C, Arbeille B, Denoeux JP, Lorette G, Bonnetblanc JM, Prost C. Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group. *Arch Dermatol*. 1995;131(1):48-52.
9. Bernard P, Bedane C, Bonnetblanc JM. Anti-BP180 autoantibodies as a marker of poor prognosis in bullous pemphigoid: a cohort analysis of 94 elderly patients. *Br J Dermatol*. 1997;136(5):694-8.

10. 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;7(5):434-40.
11. Bing L, Xiping Z, Li L, Jun P, Yi-Xia W, Min Y, Qing L, Qiu-Ning S, Hong-Zhong J, Ya-Gang Z. Levels of anti-BP180 NC16A IgE do not correlate with severity of disease in the early stages of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res.* 2015;307(9):849-54.
12. Blocker IM, Dahnrich C, Probst C, Komorowski L, Saschenbrecker S, Schlumberger W, Stocker W, Zillikens D, Schmidt E. Epitope mapping of BP230 leading to a novel enzyme-linked immunosorbent assay for autoantibodies in bullous pemphigoid. *Br J Dermatol.* 2012;166(5):964-70.
13. Bolotin D, Petronic-Rosic V. Dermatitis herpetiformis. Part I. Epidemiology, pathogenesis, and clinical presentation. *J Am Acad Dermatol.* 2011;64(6):1017-24.
14. Bolotin D, Petronic-Rosic V. Dermatitis herpetiformis. Part II. Diagnosis, management, and prognosis. *J Am Acad Dermatol.* 2011;64(6):1027-33.
15. Burton JL, Harman RR, Peachey RD, Warin RP. Azathioprine plus prednisone in treatment of pemphigoid. *Br Med J.* 1978;2(6146):1190-1.
16. Cai SC, Allen JC, Lim YL, Chua SH, Tan SH, Tang MB. Mortality of bullous pemphigoid in Singapore: risk factors and causes of death in 359 patients seen at the National Skin Centre. *Br J Dermatol.* 2014;170(6):1319-26.
17. Cai SC, Lim YL, Li W, Allen JC, Chua SH, Tan SH, Tang MB. Anti-BP180 NC16A IgG Titres as an Indicator of Disease Activity and Outcome in Asian Patients with Bullous Pemphigoid. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore.* 2015;44(4):119-26.
18. Chalmers JR, Wojnarowska F, Kirtschig G, Nunn AJ, Bratton DJ, Mason J, Foster KA, Whitham D, Williams HC, Grp BS. A randomized controlled trial to compare the safety and effectiveness of doxycycline (200 mg daily) with oral prednisolone (0.5 mg kg<sup>-1</sup> daily) for initial treatment of bullous pemphigoid: a protocol for the Bullous Pemphigoid Steroids and Tetracyclines (BLISTER) Trial. *Brit J Dermatol.* 2015;173(1):227-34.
19. Chalmers JR, Wojnarowska F, Kirtschig G, Mason J, Childs M, Whitham D, Harman K, Chapman A, Walton S, Schmidt E, Godec TR, Nunn AJ, Williams HC. A randomised controlled trial to compare the safety, effectiveness and cost-effectiveness of doxycycline (200 mg/day) with that of oral prednisolone (0.5 mg/kg/day) for initial treatment of bullous pemphigoid: the Bullous Pemphigoid Steroids and Tetracyclines (BLISTER) trial. *Health technology assessment (Winchester, England).* 2017;21(10):1-90.

20. Chan LS, Vanderlugt CJ, Hashimoto T, Nishikawa T, Zane JJ, Black MM, Wojnarowska F, Stevens SR, Chen M, Fairley JA, Woodley DT, Miller SD, Gordon KB. Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases. *J Invest Dermatol.* 1998;110(2):103-9.
21. Chan LS. Epitope spreading in paraneoplastic pemphigus: autoimmune induction in antibody-mediated blistering skin diseases. *Arch Dermatol.* 2000;136(5):663-4.
22. Charneux J, Lorin J, Vitry F, Antonicelli F, Reguiai Z, Barbe C, Tabary T, Grange F, Bernard P. Usefulness of BP230 and BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assays in the initial diagnosis of bullous pemphigoid: a retrospective study of 138 patients. *Arch Dermatol.* 2011;147(3):286-91.
23. Chen KR, Shimizu S, Miyakawa S, Ishiko A, Shimizu H, Hashimoto T. Coexistence of psoriasis and an unusual IgG-mediated subepidermal bullous dermatosis: identification of a novel 200-kDa lower lamina lucida target antigen. *Br J Dermatol.* 1996;134(2):340-6.
24. Chen R, Ning G, Zhao ML, Fleming MG, Diaz LA, Werb Z, Liu Z. Mast cells play a key role in neutrophil recruitment in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest.* 2001;108(8):1151-8.
25. Chen R, Fairley JA, Zhao ML, Giudice GJ, Zillikens D, Diaz LA, Liu Z. Macrophages, but not T and B lymphocytes, are critical for subepidermal blister formation in experimental bullous pemphigoid: macrophage-mediated neutrophil infiltration depends on mast cell activation. *J Immunol.* 2002;169(7):3987-92.
26. Chevalier V, Barbe C, Reguiai Z, Plee J, Grange F, Bernard P. Impact of neurological diseases on the prognosis of bullous pemphigoid: A retrospective study of 178 patients. *Ann Dermatol Venereol.* 2016;143(3):179-86.
27. Christophoridis S, Budinger L, Borradori L, Hunziker T, Merk HF, Hertl M. IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of BP180 in patients with bullous and cicatricial pemphigoid and linear IgA bullous dermatosis. *Br J Dermatol.* 2000;143(2):349-55.
28. Colbert RL, Allen DM, Eastwood D, Fairley JA. Mortality rate of bullous pemphigoid in a US medical center. *J Invest Dermatol.* 2004;122(5):1091-5.
29. Cordel N, Chosidow O, Hellot MF, Delaporte E, Lok C, Vaillant L, Bernard P, D'Incan M, Roujeau JC, Joly P. Neurological disorders in patients with bullous pemphigoid. *Dermatology.* 2007;215(3):187-91.
30. Cordel N, Renier M, Samyn A, Fauvel C, Hope-Rapp E, Gilbert D. Epidemiology of bullous pemphigoid in Guadeloupe (French West Indies). *Ann Dermatol Venereol.* 2009;136(12):907-9.
31. Cortes B, Marazza G, Naldi L, Combescure C, Borradori L. Mortality of bullous

- pemphigoid in Switzerland: a prospective study. *Br J Dermatol*. 2011;165(2):368-74.
32. Cozzani E, Parodi A, Rebora A, Delmonte S, Barile M, Nigro A, Priano L, Troiano G, Patri PL. Bullous pemphigoid in Liguria: a 2-year survey. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2001;15(4):317-9.
  33. Crooks V, Waller S, Smith T, Hahn TJ. The use of the Karnofsky Performance Scale in determining outcomes and risk in geriatric outpatients. *Journal of gerontology*. 1991;46(4):M139-44.
  34. Dainichi T, Koga H, Tsuji T, Ishii N, Ohyama B, Ueda A, Natsuaki Y, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, Zillikens D, Hashimoto T. From anti-p200 pemphigoid to anti-laminin gamma1 pemphigoid. *J Dermatol*. 2010;37(3):231-8.
  35. Dainichi T, Nishie W, Yamagami Y, Sonobe H, Ujiie H, Kaku Y, Kabashima K. Bullous pemphigoid suggestive of complement-independent blister formation with anti-BP180 IgG4 autoantibodies. *Br J Dermatol*. 2016;175(1):187-90.
  36. de la Fuente S, Hernandez-Martin A, de Lucas R, Gonzalez-Ensenat MA, Vicente A, Colmenero I, Gonzalez-Beato M, Sunol M, Torrelo A. Postvaccination bullous pemphigoid in infancy: report of three new cases and literature review. *Pediatr Dermatol*. 2013;30(6):741-4.
  37. Delaporte E, Dubost-Brama A, Ghohestani R, Nicolas JF, Neyrinck JL, Bergoend H, Janin A, Capron M. IgE autoantibodies directed against the major bullous pemphigoid antigen in patients with a severe form of pemphigoid. *J Immunol*. 1996;157(8):3642-7.
  38. Delgado JC, Turbay D, Yunis EJ, Yunis JJ, Morton ED, Bhol K, Norman R, Alper CA, Good RA, Ahmed R. A common major histocompatibility complex class II allele HLA-DQB1\* 0301 is present in clinical variants of pemphigoid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(16):8569-71.
  39. della Torre R, Combescure C, Cortes B, Marazza G, Beltraminelli H, Naldi L, Borradori L. Clinical presentation and diagnostic delay in bullous pemphigoid: a prospective nationwide cohort. *Br J Dermatol*. 2012;167(5):1111-7.
  40. Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Fontao L, Calabresi V, Hofmann SC, Hellmark T, Sebbag N, Pedicelli C, Sera F, Lacour JP, Wieslander J, Bruckner-Tuderman L, Borradori L, Zambruno G, Hertl M. Multicenter prospective study of the humoral autoimmune response in bullous pemphigoid. *Clin Immunol*. 2008;128(3):415-26.
  41. Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Calabresi V, Fontao L, Hofmann SC, Lacour JP, Sera F, Bruckner-Tuderman L, Zambruno G, Borradori L, Hertl M. Demonstration of epitope-spreading phenomena in bullous pemphigoid: results of a prospective multicenter study. *J Invest Dermatol*. 2011;131(11):2271-80.

42. Dilling A, Rose C, Hashimoto T, Zillikens D, Shimanovich I. Anti-p200 pemphigoid: a novel autoimmune subepidermal blistering disease. *J Dermatol.* 2007;34(1):1-8.
43. Dopp R, Schmidt E, Chimanovitch I, Leverkus M, Brocker EB, Zillikens D. IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in Bullous pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42(4):577-83.
44. Dresow SK, Sitaru C, Recke A, Oostingh GJ, Zillikens D, Gibbs BF. IgE autoantibodies against the intracellular domain of BP180. *Br J Dermatol.* 2009;160(2):429-32.
45. Dvorak AM, Mihm MC, Jr., Osage JE, Kwan TH, Austen KF, Wintroub BU. Bullous pemphigoid, an ultrastructural study of the inflammatory response: eosinophil, basophil and mast cell granule changes in multiple biopsies from one patient. *J Invest Dermatol.* 1982;78(2):91-101.
46. Egan CA, Yee C, Zillikens D, Yancey KB. Anti-p200 pemphigoid: diagnosis and treatment of a case presenting as an inflammatory subepidermal blistering disease. *J Am Acad Dermatol.* 2002;46(5):786-9.
47. Eming R, Sticherling M, Hofmann SC, Hunzelmann N, Kern JS, Kramer H, Pfeiffer C, Schuster V, Zillikens D, Goebeler M, Hertl M, Nast A, Orzechowski HD, Sardy M, Schmidt E, Sitaru C, Sporbeck B, Worm M. S2k guidelines for the treatment of pemphigus vulgaris/foiaceus and bullous pemphigoid. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2015;13(8):833-44.
48. Engineer L, Bhol K, Kumari S, Razzaque Ahmed A. Bullous pemphigoid: interaction of interleukin 5, anti-basement membrane zone antibodies and eosinophils. A preliminary observation. *Cytokine.* 2001;13(1):32-8.
49. Fairley JA, Burnett CT, Fu CL, Larson DL, Fleming MG, Giudice GJ. A pathogenic role for IgE in autoimmunity: bullous pemphigoid IgE reproduces the early phase of lesion development in human skin grafted to nu/nu mice. *J Invest Dermatol.* 2007;127(11):2605-11.
50. Fairley JA, Baum CL, Brandt DS, Messingham KA. Pathogenicity of IgE in autoimmunity: successful treatment of bullous pemphigoid with omalizumab. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(3):704-5.
51. Fania L, Caldarola G, Muller R, Brandt O, Pellicano R, Feliciani C, Hertl M. IgE recognition of bullous pemphigoid (BP)180 and BP230 in BP patients and elderly individuals with pruritic dermatoses. *Clin Immunol.* 2012;143(3):236-45.
52. Feldrihan V, Licarete E, Florea F, Cristea V, Popescu O, Sitaru C, Chiriac MT. IgG antibodies against immunodominant C-terminal epitopes of BP230 do not induce skin blistering in mice. *Hum Immunol.* 2014;75(4):354-63.

53. Fivenson DP, Breneman DL, Rosen GB, Hersh CS, Cardone S, Mutasim D. Nicotinamide and tetracycline therapy of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol.* 1994;130(6):753-8.
54. Forsti AK, Jokelainen J, Ansakorpi H, Seppanen A, Majamaa K, Timonen M, Tasanen K. Psychiatric and neurological disorders are associated with bullous pemphigoid - a nationwide Finnish Care Register study. *Scientific reports.* 2016;6:37125.
55. Forsti AK, Jokelainen J, Timonen M, Tasanen K. Risk of Death in Bullous Pemphigoid: A Retrospective Database Study in Finland. *Acta Derm Venereol.* 2016;96(6):758-61.
56. Forsti AK, Huilaja L, Schmidt E, Tasanen K. Neurological and psychiatric associations in bullous pemphigoid-more than skin deep? *Exp Dermatol.* Im Druck.
57. 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;78(4):285-90.
58. 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;82(2):139-44.
59. Garcia-Doval I, Conde Taboada A, Cruces Prado MJ. Sepsis associated with dermatologic hospitalization is not the cause of high mortality of bullous pemphigoid in Europe. *J Invest Dermatol.* 2005;124(3):666-7.
60. Ghohestani RF, Nicolas JF, Rousselle P, Claudy AL. Diagnostic value of indirect immunofluorescence on sodium chloride-split skin in differential diagnosis of subepidermal autoimmune bullous dermatoses. *Arch Dermatol.* 1997;133(9):1102-7.
61. Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA. Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J Invest Dermatol.* 1992;99(3):243-50.
62. 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;151(10):5742-50.
63. Goletz S, Hashimoto T, Zillikens D, Schmidt E. Anti-p200 pemphigoid. *J Am Acad Dermatol.* 2014;71(1):185-91.
64. Goletz S, Zillikens D, Schmidt E. Structural proteins of the dermal-epidermal junction targeted by autoantibodies in pemphigoid diseases. *Exp Dermatol.* 2017;26(12):1154-62.

65. Goto-Ohguchi Y, Nishie W, Akiyama M, Tateishi Y, Aoyagi S, Tsuji-Abe Y, Sawamura D, Ishii N, Hashimoto T, Shimizu H. A severe and refractory case of anti-p200 pemphigoid resulting in multiple skin ulcers and scar formation. *Dermatology*. 2009;218(3):265-71.
66. Grantham HJ, Stocken DD, Reynolds NJ. Doxycycline: a first-line treatment for bullous pemphigoid? *Lancet*. 2017;389(10079):1586-8.
67. Groth S, Recke A, Vafia K, Ludwig RJ, Hashimoto T, Zillikens D, Schmidt E. Development of a simple enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of autoantibodies in anti-p200 pemphigoid. *Br J Dermatol*. 2011;164(1):76-82.
68. Gudi VS, White MI, Cruickshank N, Herriot R, Edwards SL, Nimmo F, Ormerod AD. Annual incidence and mortality of bullous pemphigoid in the Grampian Region of North-east Scotland. *Br J Dermatol*. 2005;153(2):424-7.
69. Guillaume JC, Vaillant L, Bernard P, Picard C, Prost C, Labeille B, Guillot B, Foldes-Pauwels C, Prigent F, Joly P, et al. Controlled trial of azathioprine and plasma exchange in addition to prednisolone in the treatment of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol*. 1993;129(1):49-53.
70. Hashimoto T, Ohzono A, Teye K, Numata S, Hiroyasu S, Tsuruta D, Hachiya T, Kuroda K, Hashiguchi M, Kawakami T, Ishii N. Detection of IgE autoantibodies to BP180 and BP230 and their relationship to clinical features in bullous pemphigoid. *Br J Dermatol*. 2017;177(1):141-51.
71. Hirose M, Recke A, Beckmann T, Shimizu A, Ishiko A, Bieber K, Westermann J, Zillikens D, Schmidt E, Ludwig RJ. Repetitive immunization breaks tolerance to type XVII collagen and leads to bullous pemphigoid in mice. *J Immunol*. 2011;187(3):1176-83.
72. Hofmann S, Thoma-Uszynski S, Hunziker T, Bernard P, Koebnick C, Stauber A, Schuler G, Borradori L, Hertl M. Severity and phenotype of bullous pemphigoid relate to autoantibody profile against the NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal regions of the BP180 ectodomain. *J Invest Dermatol*. 2002;119(5):1065-73.
73. Hofmann SC, Voith U, Sasaki T, Trueb RM, Nischt R, Bruckner-Tuderman L. The autoantigen in anti-p200 pemphigoid is synthesized by keratinocytes and fibroblasts and is distinct from nidogen-2. *J Invest Dermatol*. 2008;128(1):87-95.
74. Holsche MM, Zillikens D, Schmidt E. Mucous membrane pemphigoid. *Hautarzt*. 2018;69(1):67-83.
75. Hopkinson SB, Baker SE, Jones JC. Molecular genetic studies of a human epidermal autoantigen (the 180-kD bullous pemphigoid antigen/BP180): identification of functionally important sequences within the BP180 molecule and evidence for an interaction between BP180 and alpha 6 integrin. *J Cell Biol*.

- 1995;130(1):117-25.
76. 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. *Molecular biology of the cell*. 2000;11(1):277-86.
  77. Hubner F, Recke A, Zillikens D, Linder R, Schmidt E. Prevalence and age distribution of pemphigus and pemphigoid diseases in Germany. *J Invest Dermatol*. 2016;136(12):2495-8.
  78. Ingen-Housz-Oro S, Roujeau JC, Ferranti V, Le Roux-Villet C, Joly P. Factors associated with delayed diagnosis of bullous pemphigoid. *Ann Dermatol Venereol*. 2009;136(10):696-701.
  79. Ishiura N, Fujimoto M, Watanabe R, Nakashima H, Kuwano Y, Yazawa N, Echigo T, Okochi H, Tamaki K. Serum levels of IgE anti-BP180 and anti-BP230 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci*. 2008;49(2):153-61.
  80. Iwata H, Hiramitsu Y, Aoyama Y, Kitajima Y. A case of anti-p200 pemphigoid: evidence for a different pathway in neutrophil recruitment compared with bullous pemphigoid. *Br J Dermatol*. 2009;160(2):462-4.
  81. Iwata Y, Komura K, Kodera M, Usuda T, Yokoyama Y, Hara T, Muroi E, Ogawa F, Takenaka M, Sato S. Correlation of IgE autoantibody to BP180 with a severe form of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol*. 2008;144(1):41-8.
  82. Jedlickova H, Hlubinka M, Pavlik T, Semradova V, Budinska E, Vlasin Z. Bullous pemphigoid and internal diseases - A case-control study. *Eur J Dermatol*. 2010;20(1):96-101.
  83. Joly P, Roujeau JC, Benichou J, Picard C, Dreno B, Delaporte E, Vaillant L, D'Incan M, Plantin P, Bedane C, Young P, Bernard P. A comparison of oral and topical corticosteroids in patients with bullous pemphigoid. *N Engl J Med*. 2002;346(5):321-7.
  84. Joly P, Benichou J, Lok C, Hellot MF, Saiag P, Tancrede-Bohin E, Sassolas B, Labeille B, Doutre MS, Gorin I, Pauwels C, Chosidow O, Caux F, Esteve E, Dutronc Y, Sigal M, Prost C, Maillard H, Guillaume JC, Roujeau JC. Prediction of survival for patients with bullous pemphigoid: a prospective study. *Arch Dermatol*. 2005;141(6):691-8.
  85. Joly P, Roujeau JC, Benichou J, Delaporte E, D'Incan M, Dreno B, Bedane C, Sparsa A, Gorin I, Picard C, Tancrede-Bohin E, Sassolas B, Lok C, Guillaume JC, Doutre MS, Richard MA, Caux F, Prost C, Plantin P, Chosidow O, Pauwels C, Maillard H, Saiag P, Descamps V, Chevrant-Breton J, Dereure O, Hellot MF,

- Esteve E, Bernard P. A comparison of two regimens of topical corticosteroids in the treatment of patients with bullous pemphigoid: a multicenter randomized study. *J Invest Dermatol.* 2009;129(7):1681-7.
86. Joly P, Baricault S, Sparsa A, Bernard P, Bedane C, Duvert-Lehembre S, Courville P, Bravard P, Remond B, Doffoel-Hantz V, Benichou J. Incidence and mortality of bullous pemphigoid in France. *J Invest Dermatol.* 2012;132(8):1998-2004.
87. Jordon RE, Beutner EH, Witebsky E, Blumental G, Hale WL, Lever WF. Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. *Jama.* 1967;200(9):751-6.
88. 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;41(2 Pt 1):266-8.
89. Kalowska M, Ciepiela O, Kowalewski C, Demkow U, Schwartz RA, Wozniak K. Enzyme-linked Immunoassay Index for Anti-NC16a IgG and IgE Auto-antibodies Correlates with Severity and Activity of Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venereol.* 2016;96(2):191-6.
90. Kasperkiewicz M, Hoppe U, Zillikens D, Schmidt E. Relapse-associated autoantibodies to BP180 in a patient with anti-p200 pemphigoid. *Clin Exp Dermatol.* 2010;35(6):614-7.
91. Kelly SE, Wojnarowska F. The use of chemically split tissue in the detection of circulating anti-basement membrane zone antibodies in bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid. *Br J Dermatol.* 1988;118(1):31-40.
92. Kippes W, Schmidt E, Roth A, Rzany B, Brocker EB, Zillikens D. Immunopathologic changes in 115 patients with bullous pemphigoid. *Hautarzt.* 1999;50(12):866-72.
93. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Nishikawa T. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 2002;30(3):224-32.
94. Koster J, Geerts D, Favre B, Borradori L, Sonnenberg A. Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin alpha6beta4 important for hemidesmosome assembly. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 2):387-99.
95. Kromminga A, Scheckenbach C, Georgi M, Hagel C, Arndt R, Christophers E, Brocker EB, Zillikens D. Patients with bullous pemphigoid and linear IgA disease show a dual IgA and IgG autoimmune response to BP180. *J Autoimmun.* 2000;15(3):293-300.
96. Kromminga A, Sitaru C, Hagel C, Herzog S, Zillikens D. Development of an ELISA for the detection of autoantibodies to BP230. *Clin Immunol.* 2004;111(1):146-52.

97. Lai YC, Yew YW, Lambert WC. Bullous pemphigoid and its association with neurological diseases: a systematic review and meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;30(12):2007-15.
98. Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJ, West J. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *Bmj.* 2008;337:a180.
99. Langan SM, Hubbard R, Fleming K, West J. A population-based study of acute medical conditions associated with bullous pemphigoid. *Br J Dermatol.* 2009;161(5):1149-52.
100. Lapiere JC, Woodley DT, Parente MG, Iwasaki T, Wynn KC, Christiano AM, Uitto J. Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. *J Clin Invest.* 1993;92(4):1831-9.
101. Lazarova Z, Sitaru C, Zillikens D, Yancey KB. Comparative analysis of methods for detection of anti-laminin 5 autoantibodies in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51(6):886-92.
102. Lee EH, Kim YH, Kim S, Kim SE, Kim SC. Usefulness of Enzyme-linked Immunosorbent Assay Using Recombinant BP180 and BP230 for Serodiagnosis and Monitoring Disease Activity of Bullous Pemphigoid. *Annals of dermatology.* 2012;24(1):45-55.
103. Lehman JS, Khunger M, Lohse CM. Infection in autoimmune bullous diseases: a retrospective comparative study. *J Dermatol.* 2013;40(8):613-9.
104. Lever WF. Pemphigus. *Medicine.* 1953;32:1-123.
105. Liu B, Zuo YG, Zhou XP, He CX, Li J, Tie D, Li L, Sun QN. Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of BP180NC16A-specific IgE and its significance in bullous pemphigoid. *Zhonghua yi xue za zhi.* 2013;93(28):2244-7.
106. Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, Giudice GJ. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest.* 1993;92(5):2480-8.
107. Liu Z, Giudice GJ, Swartz SJ, Fairley JA, Till GO, Troy JL, Diaz LA. The role of complement in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest.* 1995;95(4):1539-44.
108. London VA, Kim GH, Fairley JA, Woodley DT. Successful treatment of bullous pemphigoid with omalizumab. *Arch Dermatol.* 2012;148(11):1241-3.

109. Machado P, Michalaki H, Roche P, Gaucherand M, Thivolet J, Nicolas JF. Serological diagnosis of bullous pemphigoid (BP): comparison of the sensitivity of indirect immunofluorescence on salt-split skin to immunoblotting. *Br J Dermatol.* 1992;126(3):236-41.
110. Marazza G, Pham HC, Scharer L, Pedrazzetti PP, Hunziker T, Trueb RM, Hohl D, Itin P, Lautenschlager S, Naldi L, Borradori L. Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study. *Br J Dermatol.* 2009;161(4):861-8.
111. Marinkovich MP, Taylor TB, Keene DR, Burgeson RE, Zone JJ. LAD-1, the linear IgA bullous dermatosis autoantigen, is a novel 120-kDa anchoring filament protein synthesized by epidermal cells. *J Invest Dermatol.* 1996;106(4):734-8.
112. Mariotti F, Grosso F, Terracina M, Ruffelli M, Cordiali-Fei P, Sera F, Zambruno G, Mastrogiamomo A, Di Zenzo G. Development of a novel ELISA system for detection of anti-BP180 IgG and characterization of autoantibody profile in bullous pemphigoid patients. *Br J Dermatol.* 2004;151(5):1004-10.
113. Messingham KA, Noe MH, Chapman MA, Giudice GJ, Fairley JA. A novel ELISA reveals high frequencies of BP180-specific IgE production in bullous pemphigoid. *J Immunol Methods.* 2009;346(1-2):18-25.
114. Messingham KA, Aust S, Helfenberger J, Parker KL, Schultz S, McKillip J, Narayanan NS, Fairley JA. Autoantibodies to Collagen XVII Are Present in Parkinson's Disease and Localize to Tyrosine-Hydroxylase Positive Neurons. *J Invest Dermatol.* 2016;136(3):721-3.
115. Messingham KN, Srikantha R, DeGueme AM, Fairley JA. FcR-independent effects of IgE and IgG autoantibodies in bullous pemphigoid. *J Immunol.* 2011;187(1):553-60.
116. Mitate E, Kawano S, Nakao Y, Goto Y, Kobayashi I, Onozawa K, Hashimoto T, Nakamura S. Concurrence of autoantibodies to both laminin gamma1 and gamma2 subunits in a patient with kidney rejection response. *Acta Derm Venereol.* 2013;93(1):114-5.
117. Mitsuya J, Hara H, Ito K, Ishii N, Hashimoto T, Terui T. Metastatic ovarian carcinoma-associated subepidermal blistering disease with autoantibodies to both the p200 dermal antigen and the gamma 2 subunit of laminin 5 showing unusual clinical features. *Br J Dermatol.* 2008;158(6):1354-7.
118. Murrell DF, Daniel BS, Joly P, Borradori L, Amagai M, Hashimoto T, Caux F, Marinovic B, Sinha AA, Hertl M, Bernard P, Sirois D, Cianchini G, Fairley JA, Jonkman MF, Pandya AG, Rubenstein D, Zillikens D, Payne AS, Woodley D, Zambruno G, Aoki V, Pincelli C, Diaz L, Hall RP, Meurer M, Mascaro JM, Jr., Schmidt E, Shimizu H, Zone J, Swerlick R, Mimouni D, Culton D, Lipozencic J,

- Since B, Grando SA, Bystryn JC, Werth VP. Definitions and outcome measures for bullous pemphigoid: recommendations by an international panel of experts. *J Am Acad Dermatol*. 2012;66(3):479-85.
119. Myers DJ, Unwala RD, Xia L, Groth S, Zillikens D, Stratman EJ. Generalized annular bullous eruption--quiz case. Anti-laminin gamma1 pemphigoid with a linear IgA bullous dermatosis-like presentation. *Arch Dermatol*. 2011;147(1):109-14.
  120. Nanda A, Dvorak R, Al-Saeed K, Al-Sabah H, Alsaleh QA. Spectrum of autoimmune bullous diseases in Kuwait. *Int J Dermatol*. 2004;43(12):876-81.
  121. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Ujiie H, Nishimura M, Sawamura D, Shimizu H. Antibodies to pathogenic epitopes on type XVII collagen cause skin fragility in a complement-dependent and -independent manner. *J Immunol*. 2012;188(11):5792-9.
  122. Nemeth AJ, Klein AD, Gould EW, Schachner LA. Childhood bullous pemphigoid. Clinical and immunologic features, treatment, and prognosis. *Arch Dermatol*. 1991;127(3):378-86.
  123. Nishie W, Sawamura D, Goto M, Ito K, Shibaki A, McMillan JR, Sakai K, Nakamura H, Olasz E, Yancey KB, Akiyama M, Shimizu H. Humanization of autoantigen. *Nat Med*. 2007;13(3):378-83.
  124. Parker SR, Dyson S, Brisman S, Pennie M, Swerlick RA, Khan R, Manos S, Korman BD, Xia Z, Korman NJ. 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;59(4):582-8.
  125. Pas HH, de Jong MC, Jonkman MF, Heeres K, Slijper-Pal IJ, van der Meer JB. Bullous pemphigoid: serum antibody titre and antigen specificity. *Exp Dermatol*. 1995;4(6):372-6.
  126. Phoon YW, Fook-Chong SM, Koh HY, Thirumoorthy T, Pang SM, Lee HY. Infectious complications in bullous pemphigoid: an analysis of risk factors. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(5):834-9.
  127. Pomponi D, Di Zenzo G, Zennaro D, Calabresi V, Eming R, Zuzzi S, Bernardi ML, Scala E, Mari A. Detection of IgG and IgE reactivity to BP180 using the ISAC(R) microarray system. *Br J Dermatol*. 2013;168(6):1205-14.
  128. Provost TT, Tomasi TB, Jr. Immunopathology of bullous pemphigoid. Basement membrane deposition of IgE, alternate pathway components and fibrin. *Clin Exp Immunol*. 1974;18(2):193-200.
  129. Recke A, Oei A, Hubner F, Fechner K, Graf J, Hagenah J, May C, Voitalla D, Salmen A, Zillikens D, Gold R, Schlumberger W, Schmidt E. Parkinson disease and multiple sclerosis are not associated with autoantibodies against structural

- proteins of the dermal-epidermal junction. *Br J Dermatol.* 2016;175(2):407-9.
130. Roujeau JC, Guillaume JC, Morel P, Crickx B, Dalle E, Doutre MS, Guillot B, Godard W, Gorin I, Labeille B, et al. Plasma exchange in bullous pemphigoid. *Lancet.* 1984;2(8401):486-8.
  131. Roujeau JC, Lok C, Bastuji-Garin S, Mhalla S, Enginger V, Bernard P. High risk of death in elderly patients with extensive bullous pemphigoid. *Arch Dermatol.* 1998;134(4):465-9.
  132. Roussel A, Benichou J, Randriamanantany ZA, Gilbert D, Drenovska K, Houivet E, Tron F, Joly P. Enzyme-linked immunosorbent assay for the combination of bullous pemphigoid antigens 1 and 2 in the diagnosis of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol.* 2011;147(3):293-8.
  133. Ruhrberg C, Watt FM. The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture. *Current opinion in genetics & development.* 1997;7(3):392-7.
  134. Russo I, Saponeri A, Peserico A, Alaibac M. The use of biochip immunofluorescence microscopy for the diagnosis of *Pemphigus vulgaris*. *Acta histochemica.* 2014;116(5):713-6.
  135. Rzany B, Partscht K, Jung M, Kippes W, Mecking D, Baima B, Prudlo C, Pawelczyk B, Messmer EM, Schuhmann M, Sinkgraven R, Buchner L, Budinger L, Pfeiffer C, Sticherling M, Hertl M, Kaiser HW, Meurer M, Zillikens D, Messer G. Risk factors for lethal outcome in patients with bullous pemphigoid: low serum albumin level, high dosage of glucocorticosteroids, and old age. *Arch Dermatol.* 2002;138(7):903-8.
  136. Sakuma-Oyama Y, Powell AM, Oyama N, Albert S, Bhogal BS, Black MM. Evaluation of a BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assay in the initial diagnosis of bullous pemphigoid. *Br J Dermatol.* 2004;151(1):126-31.
  137. Schmidt E, Obe K, Brocker EB, Zillikens D. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol.* 2000;136(2):174-8.
  138. Schmidt E, Reimer S, Kruse N, Jainta S, Brocker EB, Marinkovich MP, Giudice GJ, Zillikens D. Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2000;115(5):842-8.
  139. Schmidt E, Skrobek C, Kromminga A, Hashimoto T, Messer G, Brocker EB, Yancey KB, Zillikens D. Cicatricial pemphigoid: IgA and IgG autoantibodies target epitopes on both intra- and extracellular domains of bullous pemphigoid antigen 180. *Br J Dermatol.* 2001;145(5):778-83.
  140. Schmidt E, Zillikens D. Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases.

Autoimmunity Reviews. 2010;10(2):84-9.

141. Schmidt E, della Torre R, Borradori L. Clinical features and practical diagnosis of bullous pemphigoid. *Dermatol Clin*. 2011;29(3):427-38, viii-ix.
142. Schmidt E, Zillikens D. Pemphigoid diseases. *Lancet*. 2013;381(9863):320-32.
143. Schmidt E, Borradori L, Joly P. Epidemiology of autoimmune bullous diseases. In: Murrell D (Eds) *Blistering diseases* 1st edition Springer, Heidelberg. 2015:251-64.
144. Schmidt E, Goebeler M, Hertl M, Sardy M, Sitaru C, Eming R, Hofmann SC, Hunzelmann N, Kern JS, Kramer H, Orzechowski HD, Pfeiffer C, Schuster V, Sporbeck B, Sticherling M, Worm M, Zillikens D, Nast A. S2k guideline for the diagnosis of pemphigus vulgaris/foliaceus and bullous pemphigoid. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2015;13(7):713-27.
145. Schmidt E, Groves R. Immunobullous diseases. In: Griffith C, Barker J, Chalmers, Bleiker T, Creamer D (Eds) *Rook's Textbook of Dermatology*, part 3, chapter 50, 9th edition Wiley-Blackwell, Chichester. 2016:1-56.
146. Schulze F, Kasperkiewicz M, Zillikens D, Schmidt E. Bullous pemphigoid. *Hautarzt*. 2013;64(12):931-43.
147. Schulze F, Neumann K, Recke A, Zillikens D, Linder R, Schmidt E. Malignancies in pemphigus and pemphigoid diseases. *J Invest Dermatol*. 2015;135(5):1445-7.
148. Schulze FS, Beckmann T, Nimmerjahn F, Ishiko A, Collin M, Kohl J, Goletz S, Zillikens D, Ludwig R, Schmidt E. Fcγ receptors III and IV mediate tissue destruction in a novel adult mouse model of bullous pemphigoid. *Am J Pathol*. 2014;184(8):2185-96.
149. Serwin AB, Bokinieć E, Piasek M, Masny D, Chodyncka B. Epidemiological and clinical analysis of pemphigoid patients in northeastern Poland in 2000-2005. *Med Sci Monit*. 2007;13(8):CR360-4.
150. Shimanovich I, Hirako Y, Sitaru C, Hashimoto T, Brocker EB, Butt E, Zillikens D. The autoantigen of anti-p200 pemphigoid is an acidic noncollagenous N-linked glycoprotein of the cutaneous basement membrane. *J Invest Dermatol*. 2003;121(6):1402-8.
151. Shimanovich I, Mihai S, Oostingh GJ, Ilenchuk TT, Brocker EB, Opdenakker G, Zillikens D, Sitaru C. Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *J Pathol*. 2004;204(5):519-27.
152. Shimizu A, Funakoshi T, Ishibashi M, Yoshida T, Koga H, Hashimoto T, Amagai M, Ishiko A. Immunoglobulin G deposition to nonhemidesmosomal lamina lucida and

- early neutrophil involvement are characteristic features in a case of anti-p200 pemphigoid. *Br J Dermatol.* 2013;168(3):647-55.
153. Sitaru C, Kromminga A, Hashimoto T, Brocker EB, Zillikens D. Autoantibodies to type VII collagen mediate Fc $\gamma$ -dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *Am J Pathol.* 2002;161(1):301-11.
  154. 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;118(4):664-71.
  155. Sitaru C, Dahnrich C, Probst C, Komorowski L, Blocker I, Schmidt E, Schlumberger W, Rose C, Stocker W, Zillikens D. Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies. *Exp Dermatol.* 2007;16(9):770-7.
  156. Skaria M, Jaunin F, Hunziker T, Riou S, Schumann H, Bruckner-Tuderman L, Hertl M, Bernard P, Saurat JH, Favre B, Borradori L. 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;114(5):998-1004.
  157. Taghipour K, Chi CC, Vincent A, Groves RW, Venning V, Wojnarowska F. The association of bullous pemphigoid with cerebrovascular disease and dementia: a case-control study. *Arch Dermatol.* 2010;146(11):1251-4.
  158. Tampoia M, Lattanzi V, Zucano A, Villalta D, Filotico R, Fontana A, Vena GA, Di Serio F. Evaluation of a new ELISA assay for detection of BP230 autoantibodies in bullous pemphigoid. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1173:15-20.
  159. Tampoia M, Zucano A, Villalta D, Antico A, Bizzaro N. Anti-skin specific autoantibodies detected by a new immunofluorescence multiplex biochip method in patients with autoimmune bullous diseases. *Dermatology.* 2012;225(1):37-44.
  160. Thoma-Uszynski S, Uter W, Schwietzke S, Hofmann SC, Hunziker T, Bernard P, Treudler R, Zouboulis CC, Schuler G, Borradori L, Hertl M. BP230- and BP180-specific auto-antibodies in bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 2004;122(6):1413-22.
  161. Tsuji-Abe Y, Akiyama M, Yamanaka Y, Kikuchi T, Sato-Matsumura KC, Shimizu H. Correlation of clinical severity and ELISA indices for the NC16A domain of BP180 measured using BP180 ELISA kit in bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 2005;37(3):145-9.
  162. Ujiie H, Sasaoka T, Izumi K, Nishie W, Shinkuma S, Natsuga K, Nakamura H,

- Shibaki A, Shimizu H. Bullous pemphigoid autoantibodies directly induce blister formation without complement activation. *J Immunol.* 2014;193(9):4415-28.
163. Vafia K, Groth S, Beckmann T, Hirose M, Dworschak J, Recke A, Ludwig RJ, Hashimoto T, Zillikens D, Schmidt E. Pathogenicity of autoantibodies in anti-p200 pemphigoid. *PLoS One.* 2012;7(7):e41769.
164. van Beek N, Rentzsch K, Probst C, Komorowski L, Kasperkiewicz M, Fechner K, Blocker IM, Zillikens D, Stocker W, Schmidt E. 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;7(1):49.
165. van Beek N, Schulze FS, Zillikens D, Schmidt E. IgE-mediated mechanisms in bullous pemphigoid and other autoimmune bullous diseases. *Expert review of clinical immunology.* 2016;12(3):267-77.
166. van Beek N, Luttmann N, Huebner F, Recke A, Karl I, Schulze FS, Zillikens D, Schmidt E. Correlation of Serum Levels of IgE Autoantibodies Against BP180 With Bullous Pemphigoid Disease Activity. *JAMA Dermatol.* 2017;153(1):30-8.
167. Waisbourd-Zinman O, Ben-Amitai D, Cohen AD, Feinmesser M, Mimouni D, Adir-Shani A, Zlotkin M, Zvulunov A. Bullous pemphigoid in infancy: Clinical and epidemiologic characteristics. *J Am Acad Dermatol.* 2008;58(1):41-8.
168. Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet.* 2016;387(10023):1109-22.
169. Williams HC, Wojnarowska F, Kirtschig G, Mason J, Godec TR, Schmidt E, Chalmers JR, Childs M, Walton S, Harman K, Chapman A, Whitham D, Nunn AJ. Doxycycline versus prednisolone as an initial treatment strategy for bullous pemphigoid: a pragmatic, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet.* 2017;389(10079):1630-8.
170. Wong SN, Chua SH. Spectrum of subepidermal immunobullous disorders seen at the National Skin Centre, Singapore: a 2-year review. *Br J Dermatol.* 2002;147(3):476-80.
171. Yamane N, Sawamura D, Nishie W, Abe M, Kodama K, Adachi K, Nakamura H, Ishii N, Hashimoto T, Shimizu H. Anti-p200 pemphigoid in a 17-year-old girl successfully treated with systemic corticosteroid and dapsone. *Br J Dermatol.* 2007;156(5):1075-8.
172. Yayli S, Pelivani N, Beltraminelli H, Wirthmuller U, Beleznavy Z, Horn M, Borradori L. Detection of linear IgE deposits in bullous pemphigoid and mucous membrane pemphigoid: a useful clue for diagnosis. *Br J Dermatol.* 2011;165(5):1133-7.
173. Yoshida M, Hamada T, Amagai M, Hashimoto K, Uehara R, Yamaguchi K, Imamura K, Okamoto E, Yasumoto S, Hashimoto T. Enzyme-linked

- immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 2006;41(1):21-30.
174. Yu KK, Crew AB, Messingham KA, Fairley JA, Woodley DT. Omalizumab therapy for bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol.* 2014;71(3):468-74.
  175. Yu X, Holdorf K, Kasper B, Zillikens D, Ludwig RJ, Petersen F. FcγRIIA and FcγRIIB are required for autoantibody-induced tissue damage in experimental human models of bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 2010;130(12):2841-4.
  176. Zarian H, Saponeri A, Michelotto A, Zattra E, Belloni-Fortina A, Alaibac M. Biochip technology for the serological diagnosis of bullous pemphigoid. *ISRN Dermatol.* 2012;2012:237802.
  177. Zillikens D, Wever S, Roth A, Weidenthaler-Barth B, Hashimoto T, Brocker EB. Incidence of autoimmune subepidermal blistering dermatoses in a region of central Germany. *Arch Dermatol.* 1995;131(8):957-8.
  178. Zillikens D, Kawahara Y, Ishiko A, Shimizu H, Mayer J, Rank CV, Liu Z, Giudice GJ, Tran HH, Marinkovich MP, Brocker EB, Hashimoto T. A novel subepidermal blistering disease with autoantibodies to a 200-kDa antigen of the basement membrane zone. *J Invest Dermatol.* 1996;106(6):1333-8.
  179. Zillikens D, Rose PA, Balding SD, Liu Z, Olague-Marchan M, Diaz LA, Giudice GJ. Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. *J Invest Dermatol.* 1997;109(4):573-9.
  180. Zillikens D, Herzele K, Georgi M, Schmidt E, Chimanovitch I, Schumann H, Mascaro JM, Jr., Diaz LA, Bruckner-Tuderman L, Brocker EB, Giudice GJ. Autoantibodies in a subgroup of patients with linear IgA disease react with the NC16A domain of BP180. *J Invest Dermatol.* 1999;113(6):947-53.
  181. Zillikens D, Ishiko A, Jonkman MF, Chimanovitch I, Shimizu H, Hashimoto T, Brocker EB. Autoantibodies in anti-p200 pemphigoid stain skin lacking laminin 5 and type VII collagen. *Br J Dermatol.* 2000;143(5):1043-9.
  182. Zillikens D. Bullöse Autoimmundermatosen. In: Plewig G, Landthaler M, Burgdorf WHC et al (Hrsg) *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, 6 Aufl Springer, Berlin. 2012:777-811.
  183. 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;127(5):1167-74.

# 8. Anhang

## 8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
BP	bullöses Pemphigoid
BPDAI	Bullous Pemphigoid Disease Area Index
BSA	bovines Serum Albumin
DE	dermales Extrakt
DIF	direkte Immunfluoreszenz Mikroskopie
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fc	crystallisable fragment
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
gC	globuläre C-Domäne
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HaCaT	Humane Keratinozyten Zell-Linie
HRP	Horseradish Meerrettichperoxidase
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IIF	indirekte Immunfluoreszenz Mikroskopie
IVIG	intravenöse hochdosierte Immunglobuline
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LAD-1	lineare IgA Dermatose Antigen-1
LAMA3	Laminin $\alpha$ -3
M	Molare Masse
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MMP	Magermilchpulver
NaCl	Natriumchlorid
NHS	Normales humanes Serum

PBS	Phosphate buffered saline
PK	Positivkontrolle
RE	relative Einheiten
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-buffered saline plus tween puffer
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter

## 8.2 Materialien

### Verwendete Geräte und Hilfsmittel

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav	WEBECO GmbH, Selmsdorf, Deutschland
Biofuge pico	Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland
Biorad Mini-Incubation Trays	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Combitips advanced (2,5/5ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Dako Pen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
ELISA Reader (Opsys MR)	Dynex Technologies GmbH, Denkendorf, Deutschland
ELISA Reader Victor 3 Wallac 1420	Wallac, Perkin-Elmer, LAS, Rodgau, Deutschland
EUROstar Fluoreszenzmikroskop	EUROIMMUN medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop HS BZ-9000	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
G 7883 (Spülmaschine)	Miele & Cie. KG, Gütersloh, Deutschland
Gefrierschrank (-20° C)	Robert Bosch GmbH, Gerlingen, Deutschland
Incubator	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
KS 250basic (Schüttler)	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Kühlraum	Viessmann Kältetechnik GmbH, Mainz, Deutschland
Laborwecker	Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnetrührer IKA ® RH basic 2	IKA ® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mappe (für Objektträger)	Marburger Signier-Technik-Systeme GmbH & Co. KG, Marburg, Deutschland

Messzylinder 500ml	Vit Lab GmbH, Grossostheim, Deutschland
Midi-Rack, gelb 10 Plätze	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Objektträgerkasten	Werner Hassa GmbH, Lübeck, Deutschland
Pinzette	Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipettus reddot	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Reaktionsgefäßständer	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Reference Pipette (1000)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Research Pipette (10, 20, 100, 200, 1000)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Research Pipette 300 (Multipipette)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Revco Ultima Plus (-80° C)	Thermo Fischer Scientific, Asheville, USA
Röntgenkassette	Dr. Goos-Suprema GmbH, Heidelberg, Deutschland
Rotlicht	Kindermann GmbH, Ochsenfurt
Rührmagnet	Keison Products, Chelmsford, England
Serologische Pipette (5, 10, 25ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Taumlern Duomax 1030,	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wanne	Hindrex, Wuppertal

## Verwendete Chemikalien

<b>Name</b>	<b>Hersteller/Zusammensetzung</b>
AGFA G 153 Entwickler	BW Plus Röntgen GmbH & Co.KG, Kamp-Lintfort, Deutschland
AGFA G 354 Fixier	BW Plus Röntgen GmbH & Co.KG, Kamp-Lintfort, Deutschland
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Medical Systems Information Technologies GmbH, Freiburg, Deutschland
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Medical Systems Information Technologies GmbH, Freiburg, Deutschland
Aqua dest.	Apotheke UK-SH Lübeck
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Microscopy DAB-Puffertabletten	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mowiol 4-88	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PBS	8 g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 1,44 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in ddH <sub>2</sub> O
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris-HCl	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

## Verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Deckgläser	MARIENFELD GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Peha-Soft (Handschuhe)	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Pipettenspitze (10, 200, 1000)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5ml mit Deckel	Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland
Röhre 15ml [Falcon]	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Röhre 50ml [Falcon]	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
SafeSeal Gefäß 1,5ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäß 2ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Universalfilm Super RX-N	Fujifilm, Tokio, Japan

## Sonstiges

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-BP180-NC16A-4X-ELISA (IgG)	EUROIMMUN medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Deutschland
Anti-BP230-CF-ELISA (IgG)	EUROIMMUN medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Deutschland
Conjugate F(ab') <sub>2</sub> Anti-IgA	Bio-Rad, Marne-la-Coquette, Frankreich
Conjugate F(ab') <sub>2</sub> Anti-IgG	Bio-Rad, Marne-la-Coquette, Frankreich
Gesamt-IgE-ELISA	EUROIMMUN medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Deutschland
Goat Anti-Rabbit-IgG-HRP	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

Monoclonal Rabbit Anti-Laminin gamma-2 Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Mouse Anti-Human-IgG4 – HRP	Southern Biotech vertrieben von Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland
Polyclonal Rabbit Anti-Human-IgA-HRP	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Polyclonal Rabbit Anti-Human-IgG-HRP	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Polyclonal Rabbit Anti-LAMA3 Antikörper	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Polyclonal Rabbit Anti-Laminin beta-3 Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Rabbit Anti-Mouse-IgG-HRP	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

## 9. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. E. Schmidt für die Bereitstellung des Themas, die stetigen Anregungen und Motivation.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. D. Zillikens, Direktor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck, für die Möglichkeit der Durchführung der Dissertation an seiner Klinik.

Ich bedanke mich bei der klinischen Forschergruppe 303: Pemphigoid Diseases – Molecular Pathways and their Therapeutic Potential für die Unterstützung im Rahmen eines Stipendiums während der Durchführung des praktischen Teils der Dissertation.

Zu großem Dank bin ich Frau Prof. Dr. rer. biol. hum. I. König für die Hilfe bei der statistischen Auswertung sowie die Diskussionen über mögliche Fragestellungen verpflichtet.

Nicht weniger möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. S. Goletz für die Hilfe in allen Belangen bedanken. Sie hat mich über die gesamte Zeit begleitet.

Vanessa Krull danke ich für die unermüdliche Hilfe bei der Umsetzung dieser Arbeit. Sie hatte immer ein offenes Ohr und eine helfende Hand für mich.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Hywel C. Williams für die Überlassung der Seren der BLISTER Studie sowie die Bereitstellung der klinischen Daten bedanken.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern der Forschungslabore, insbesondere der AG Schmidt, für ihre stetige Hilfe bei allen aufkommenden Fragen und die gute Zusammenarbeit im Labor. Es war mir eine große Freude.

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei meiner Familie für ihre Begleitung und Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken.

Zuletzt gilt mein tiefster Dank meinem Ehemann für seine unendliche Geduld.

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Maike Marleen Holtsche,  
geb. Wittfeld  
geboren am 16. Dezember 1989  
in Offenbach am Main



### Hochschulstudium

10/2009 – 04/2012 Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig  
09/2011 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
05/2012 – 11/2015 Studium der Humanmedizin an der Universität zu  
Lübeck  
10/2014 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
11/2014 – 10/2015 Praktisches Jahr  
11/2015 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### Praktisches Jahr

11/2014 – 03/2015 Dermatologie, Allergologie und Venerologie,  
Universitätsklinikum Lübeck  
04/2015 – 06/2015 Innere Medizin, St. Georg Klinikum Leipzig  
07/2015 – 10/2015 Chirurgie, Schön Klinikum Neustadt

### Dissertation

12/2015 – 03/2016 praktischer Teil der Dissertation im Rahmen eines  
Stipendiums der KFO 303: Pemphigoid Diseases -  
Molecular Pathways and their Therapeutic Potential  
01/2018 Fertigstellung der Arbeit

### Beruflicher Werdegang

seit 04/2016 Weiterbildungsassistentin in der Klinik für Dermatologie,  
Allergologie und Venerologie, Universitätsklinikum  
Lübeck

# 11. Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

## Publikationen

1. **M. M. Holtsche**, S. Goletz, N. van Beek, D. Zillikens, S. Benoit, K. Harman, S. Walton, J. English, M. Sticherling, A. Chapman, N. J. Levell, R. Groves, H. C. Williams, I. R. König, E. Schmidt and members of the BLISTER Study Group\*. Association of high serum anti-BP180 IgG levels with increased mortality in the prospective multicenter Bullous Pemphigoid Steroids and Tetracyclines (BLISTER) trial. Eingereicht.
2. **M. M. Holtsche**, D. Zillikens, E. Schmidt. Mucous membrane pemphigoid. Hautarzt. 2018;69(1):67-83.
3. Kasprick A, **Holtsche MM**, Rose EL, Hussain S, Schmidt E, Petersen F, Panicker S, Ludwig RJ. The anti-C1s antibody TNT003 prevents complement activation in the skin induced by bullous pemphigoid autoantibodies. J Invest Dermatol., im Druck.
4. Bieber K, Ernst AL, Tukaj S, **Holtsche MM**, Schmidt E, Zillikens D, Ludwig RJ, Kasperkiewicz M. Analysis of serum markers of cellular immune activation in patients with bullous pemphigoid. Exp Dermatol., im Druck.

## Vorträge

1. **M. M. Holtsche**. Association of high serum anti-BP180 IgE and IgG levels with increased mortality in the prospective multicenter Bullous Pemphigoid Steroids and Tetracyclines (BLISTER) trial. Arbeitsgruppensitzung Bullöse Autoimmundermatosen, 44. Tagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Göttingen, 9.-11.03.2017.
2. **M. M. Holtsche**. Assoziation von Serumautoantikörpern mit der Klinik und dem Outcome der BLISTER (Bullous Pemphigoid Steroids and Tetracyclines) Studie. 49. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, Berlin, 26.04.-29.04. 2017.

3. **M. M. Holtsche.** Association of high serum anti-BP180 IgE and IgG levels with increased mortality in the prospective multicenter Bullous Pemphigoid Steroids and Tetracyclines (BLISTER) trial. Oral und Poster Presentation. 4th Scientific Conference of the International Pemphigus & Pemphigoid Foundation, Lübeck, 22.06.-23.06. 2017.