

Aus dem Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED)
der Universität zu Lübeck

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. Enno Schmidt

**Untersuchung der Reaktivität humaner Serumantikörper mit Fragmenten der
BP180 Ektodomäne bei bullösem Pemphigoid und Schleimhautpemphigoid**

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Jonathan Tegtmeyer

aus Lübeck

Lübeck 2021

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

2. Berichterstatterin/ Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

Promotionskommission der Sektion Medizin

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. ZUSAMMENFASSUNG UND SUMMARY	8
1.1 Zusammenfassung	8
1.2 Summary	9
2. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	10
2.1 Bullöse Autoimmundermatosen	10
2.2 Bullöses Pemphigoid	11
2.2.1 Epidemiologie	11
2.2.2 Klinik	12
2.2.3 Pathogenese	13
2.3 Schleimhautpemphigoid	15
2.3.1 Epidemiologie	15
2.3.2 Klinik	16
2.3.3 Pathogenese	17
2.4 Diagnostik des BP und SHP	18
2.5 Fragestellung	22
3. MATERIAL	23
3.1 Geräte	23
3.2 Verbrauchsprodukte	24
3.3 Verwendete Kits	25
3.4 Reagenzien	25
3.5 Lösungen und Puffer	27
3.6 Gele/ Agarplatten	28
3.7 Enzyme	29
3.8 Vektoren	29
3.8.1 Plasmide	29
3.9 Proteine	30
3.10 Antikörper	30
3.11 Probenmaterial	31
3.11.1 Patientenseren	31
3.11.2 Zelllinien	31
3.11.3 Bakterienstämme	31
3.12 Medien	32
4. METHODEN	33
4.1 Arbeiten mit Bakterien	33
4.1.1 Transformation kompetenter Bakterien	33
4.1.2 Extraktion des Plasmids	33
4.2 Zellbiologische Verfahren	33

4.2.1 HaCaT Zelllinie-----	33
4.2.2 Proteinextrakte aus HaCaT Zellen -----	34
4.2.3 HEK293 Zelllinie-----	35
4.2.4 Transfektion der HEK293 Zellen mit BP180-pcDNA3-----	35
4.3 Arbeiten mit Proteinen-----	35
4.3.1 Rekombinante Proteine-----	35
4.3.2 Konzentrationsbestimmung BP180(EK) Fragmente -----	38
4.4 SDS-PAGE-----	39
4.4.1 Prinzip-----	39
4.4.2 Protokoll-----	39
4.5 Immunblot-----	40
4.5.1 Prinzip-----	40
4.5.2 Protokoll-----	40
5. ERGEBNISSE-----	43
5.1 LAD-1 Immunblot-----	43
5.2 Extrazelluläre Matrix-----	45
5.3 Reaktivität der BP und SHP Seren mit BP180(VL) und BP180(EK) -----	47
5.4 Reaktivität der BP und SHP Seren mit BP180(EK) Fragmenten 1-4-----	49
5.5 Zusammenfassung der Serumreaktivität-----	56
6. DISKUSSION-----	58
6.1 Weiterentwicklung des LAD-1 Immunblots -----	59
6.2 Reaktivität der BP180 Substrate-----	60
6.2.1 BP180(VL) und BP180(EK)-----	60
6.2.2 BP180(EK) Fragmente 1-4-----	63
6.3 Limitationen-----	67
6.4 Ausblick-----	68
7. LITERATURVERZEICHNIS-----	69
8. ANHÄNGE-----	83
8.1 Publikationen und Kongressbeiträge-----	83
9. DANKSAGUNGEN-----	84
10. LEBENSLAUF-----	85

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
AP	Alkalische Phosphatase
BP	Bullöses Pemphigoid
BPDAI	Bullöses Pemphigoid Disease Area Index
BP180(EK)	BP180 Ektodomäne
BP180(EK) F	BP180(EK) Fragment
BP180(VL)	BP180 Volllängenprotein
BSA	bovines Serum Albumin
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
DIF	direkte Immunfluoreszenz
DEJ	Dermoepitheliale Junktionszone
ELISA	engl. <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
F	Fragment
GBS	gesunde Blutspender
HaCaT	Humane Keratinozyten Zelllinie
HE	Hämatoxylin-Eosin (Färbung)
HRP	engl. <i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
kDa	Kilodalton
LAD-1	Lineare IgA-Dermatose Antigen-1
LAMA3	Laminin α 3
LIED	Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie
MMP	Magermilchpulver
NC16A	16. Nichtkollagene Domäne (BP180)
PBS	engl. <i>Phosphate-buffered saline</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PK	Positivkontrolle
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

SHP	Schleimhautpemphigoid
Tab.	Tabelle
TBST	engl. <i>Tris-buffered saline plus tween puffer</i>

Für Aminosäuren wurden die allgemein gültigen Abkürzungen verwendet. Allgemein gültige physikalische Größen und Einheiten werden im Abkürzungsverzeichnis nicht aufgeführt. Englische Fachtermini wurden bei unzulänglicher Übersetzungsmöglichkeit ins Deutsche beibehalten.

1. ZUSAMMENFASSUNG UND SUMMARY

1.1 Zusammenfassung

BP180 (Kollagen XVII) ist das Hauptautoantigen der Pemphigoiderkrankungen. Die 16. nichtkollagene Domäne (NC16A) fungiert in 75-90 % der bullösen Pemphigoid (BP) und 50 % der BP180-spezifischen Schleimhautpemphigoid (SHP) Seren als immundominantes Epitop und findet in hoch sensitiven sowie spezifischen kommerziell erhältlichen ELISA Systemen Anwendung. Jedoch ist für die BP180-spezifischen NC16A-negativen Patienten bislang kein standardisierter Test verfügbar. Die vorliegende Dissertation umfasst die experimentelle Validierung der Reaktivität humaner IgG Serumautoantikörper mit rekombinanten Fragmenten der BP180 Ektodomäne im Immunblot bei BP und SHP. Insgesamt wurden 196 Patientenserum mittels bisherigem LAD-1 (Lineare IgA-Dermatose Antigen-1) Immunblot analysiert. Hierbei handelt es sich um die lösliche Ektodomäne von BP180, welche durch Proteolyse kontinuierlich von der Keratinozytenoberfläche abgespalten wird. Die Auswertung ergab durch eine nun mehr reproduzierbare Doppelbande bei 120 kDa eine neue spezifische Differenzierungsmöglichkeit, welche in die weitere Validierung der Analysen aufgenommen wurde. Dementsprechend blieben 51 BP und 30 SHP Seren mit einem positiven modifizierten LAD-1 Immunblotergebnis und negativer Reaktivität gegenüber NC16A sowie 54 gesunde Blutspender als Negativkontrolle für die Auswertung verwertbar. Darüber hinaus wurde die vergleichende Testung der verwendeten Seren mit der rekombinanten Ektodomäne (BP180(EK)) und dem Volllängenprotein von BP180 (BP180(VL)) im Immunblot durchgeführt. Zunächst erfolgte die Präparation der rekombinanten Fragmente der BP180 Ektodomäne (F1-4) und die Optimierung der Immunblots, gefolgt von der Testung der Seren. Hierbei ergab sich für die Immunblots von BP180(VL), BP180(EK) und F3 eine Sensitivität von 100 % (51/ 51) bzw. jeweils 98 % (50/ 51) bei BP. Die Spezifität von BP180(VL), BP180(EK) betrug jeweils 94 % und von F3 98 %. F1, 2 und 4 zeigten dagegen Sensitivitäten von 22 %, 41 % bzw. 71 % bei BP bei einer Spezifität von jeweils 91 %, 89 % und 89 %. Bei der Testung von SHP Seren ergab sich die höchste Sensitivität für BP180(EK), F3 und BP180(VL) mit 87 % (26/ 30), 77 % (23/ 30) bzw. 73 % (22/ 30), für die Substrate F1, 2 und 4 fiel diese dagegen mit 13 %, 53 % und 63 % deutlich geringer aus. Somit findet sich mit der vorliegenden Arbeit die Autoantikörperreaktivität mit der BP180(EK) bei Negativität gegen NC16A in BP und SHP Seren bestätigt. Insbesondere F3 bildet hierbei ein immundominantes Epitop der C-terminalen Ektodomäne als ein potenzielles Substrat für zukünftige Testsysteme für die Detektion NC16A-negativer und LAD-1-positiver BP und SHP Patienten.

1.2 Summary

BP180 (collagen XVII) is the major autoantigen of pemphigoid diseases. The noncollagenous domain 16A (NC16A) is the immunodominant stretch in 75-90 % of bullous pemphigoid (BP) and 50 % of BP180-specific mucous membrane pemphigoid (MMP) sera. The NC16A domain is used in highly sensitive as well as specific, commercially available ELISA systems. However, no standardized assay is yet available for BP180-specific NC16A-negative patients with BP and MMP. The present doctoral thesis comprises the experimental validation of the reactivity of human IgG serum autoantibodies with recombinant fragments of the BP180 ectodomain in BP and MMP. A total of 196 patient sera were analyzed using LAD-1 (linear IgA-dermatosis antigen-1), the soluble ectodomain of BP180 by immunoblotting. LAD-1 is continuously shed from the surface of cultivated keratinocytes by proteolysis. The present analysis revealed a reproducible double band at 120 kDa, instead of the previously detected single band, which led to a more specific differentiation of the sera. Accordingly, 51 BP and 30 MMP sera with IgG reactivity against LAD-1 in the modified immunoblot and without reactivity to NC16A were included in this study. Sera of healthy blood donors served as controls. In addition, comparative immunoblot testing of the sera with the recombinant ectodomain (BP180(EK)) and the full-length protein of BP180 (BP180(VL)) was performed. First, the recombinant fragments of the BP180 ectodomain (F1-4) were prepared and the immunoblots were optimized, followed by testing of the sera. Here, the sensitivities of the immunoblots of BP180(VL), BP180(EK) and F3 were 100 % (51/ 51), 98 % (50/ 51) and 98 % (50/ 51) for BP. The specificities of BP180(VL), BP180(EK) were 94 % and F3 98 %. In contrast, F1, 2 and 4 showed sensitivities of 22 %, 41 % and 71 % for BP, with specificities of 91 %, 89 % and 89 %, respectively. When MMP sera were tested, the highest sensitivities were found for BP180(EK), F3, and BP180(VL) with 87 % (26/ 30), 77 % (23/ 30), and 73 % (22/ 30), whereas for substrates F1, 2, and 4 it was significantly lower with 13 %, 53 %, and 63 %, respectively. Thus, the present work confirms autoantibody reactivity with BP180(EK) in NC16A negative BP and MMP sera. In particular, F3 as an immunodominant epitope of the C-terminal ectodomain, may play a key role as a potential substrate for future test systems for the detection of IgG reactivity against BP180 in NC16A-negative in BP and MMP sera.

2. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

2.1 Bullöse Autoimmundermatosen

Blasenbildende Autoimmundermatosen (engl. *AIBD*) gehören zu den organspezifischen Autoimmunerkrankungen. Diese klinisch und immunpathologisch heterogene Gruppe seltener Hauterkrankungen definiert sich über das Charakteristikum spezifischer Autoantikörper gegen epidermale wie auch mukosale Antigene. Das bullöse Pemphigoid (BP) und das Schleimhautpemphigoid (SHP) stellen hierbei die häufigsten Autoimmundermatosen dar (1, 2). Durch die seit Jahren steigende Inzidenz mit aktuell mehr als 23000 Patienten in Deutschland, sowie die wachsende krankheitsbezogene Morbidität und Mortalität, erlangen beide Erkrankungen zunehmende medizinisch-wissenschaftliche Aufmerksamkeit (3).

Bereits 1953 beschrieb Lever die klinische und histopathologische Abgrenzung subepidermal spaltbildender Pemphigoiderkrankungen von intraepidermal spaltbildenden und akantholytischen Pemphigus Formen (4). Erstmals gelang es 1967 gewebegebundene wie auch im Serum zirkulierende Antikörper bei Autoimmundermatosen nachzuweisen (5). Die hiermit verbundene Reaktivität gegen diverse Strukturproteine der dermoepidermalen Junctionszone, insbesondere Hemidesmosomen und Basalmembran (Pemphigoid Gruppe), Desmosomen (Pemphigus Gruppe) sowie epidermale und Gewebs-Transglutaminase (Dermatitis herpetiformis) konnte nachfolgend als Ursache krankheitstypischer autoimmunologisch-inflammatorischer Destabilisierung und Zerstörung struktureller Proteinkomplexe identifiziert werden (1, 6).

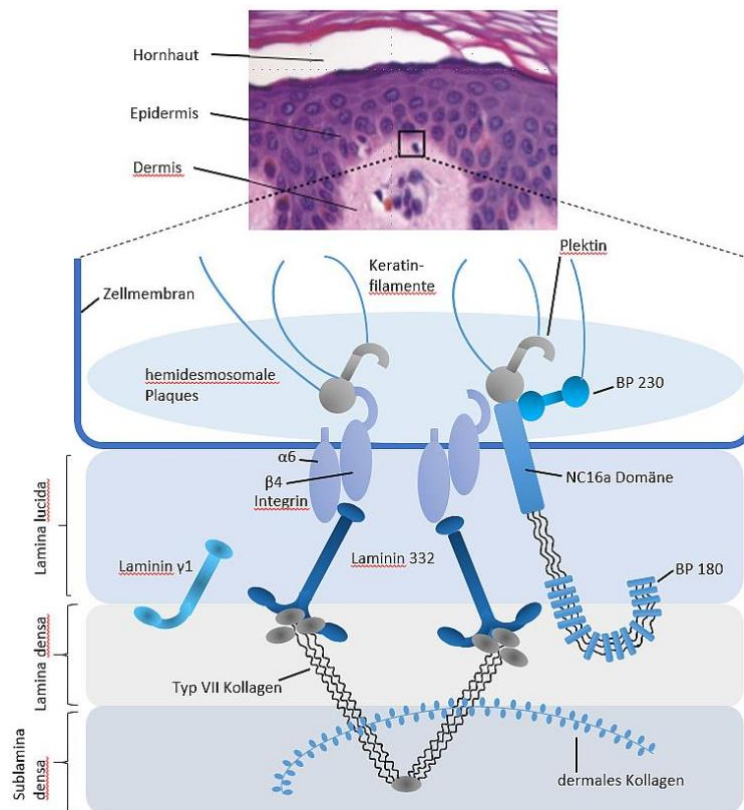


Abb. 1: Schematische Darstellung der dermoepidermalen Junctionszone

Die Antigene autoimmunologischer Autoantikörper bei Pemphigoiderkrankungen sind abgebildet (1).

Bei Pemphiguserkrankungen bilden transmembranöse Adhäsionsmoleküle des Cadherin-Typs Desmoglein 1 und 3 maßgebliche Zielantigene. Da es sich hierbei um desmosomale Proteine handelt, führt deren Schädigung zu intraepidermaler Blasenbildung (6). Ist die autoimmunologische Reaktion gegen hemidesmosomale bzw. hemidesmosomal assoziierte Zielantigene gerichtet, sind Pemphigoiderkrankungen die Folge. Hierbei stellen BP230, BP180 (Kollagen XVII), $\alpha6\beta4$ Integrin, Laminin 332, Laminin $\gamma1$ und Kollagen VII krankheitstypische Zielantigene dar (Abb. 1), wobei BP180 und BP230 als Hauptantigene des BP gelten (1). Bei der Dermatitis herpetiformis findet sich eine spezifische Antikörperreaktivität gegen epidermale Transglutaminase (TG3) (7).

2.2 Bullöses Pemphigoid

2.2.1 Epidemiologie

Das bullöse Pemphigoid (BP) ist die häufigste blasenbildende Autoimmundermatose. Die Inzidenz variiert europaweit zwischen 2,5 und 66 / Mio. Einwohner/ Jahr mit einem Höchstwert in Großbritannien, wohingegen in Deutschland eine Inzidenz zwischen 10-20/ Mio.

Einwohner/ Jahr angegeben wird (8–10). Im Laufe der letzten 10 Jahre hat sich das Auftreten des BP in Zentraleuropa mehr als verdoppelt (11). Die Prävalenz in Deutschland wird auf 259,3/ Mio. Einwohner geschätzt (3). Die Begründung für die starke Zunahme der Inzidenz wird der zunehmenden Alterung der Bevölkerung, der verbesserten Diagnostik wie auch der Zunahme von Risikofaktoren wie der Komorbidität mit sowohl neurologischen als auch psychiatrischen Erkrankungen (Demenz, Morbus Parkinson, Apoplexie, Epilepsie, Multiple Sklerose sowie affektive Störungen) und der Medikamenteneinnahme (u. a. Spironolacton und Phentothiazide) zugeschrieben (11–13). Zudem können bei BP Patienten andere Autoimmunerkrankungen vorliegen, wobei die Schilddrüse bei US-amerikanischen Patienten am häufigsten betroffen ist (14). Im Kindesalter tritt das BP mit einer Prävalenz von 4,9/ Mio. Kinder deutlich seltener auf als der Pemphigus vulgaris und die lineare IgA Dermatose mit 30,5 Fällen bzw. 24,5/ Mio. Menschen mit einem Alter von unter 18 Jahren (15).

Das BP gilt als Erkrankung des älteren Menschen mit einem mittleren Krankheitsbeginn zwischen 75 und 80 Jahren, deren Inzidenz ab einem Alter von 80 Jahren von 190 bis 312/ Mio. Einwohner rasant ansteigt. Dabei sind Frauen mit 52-60 % der Fälle etwas häufiger betroffen als Männer (10, 11, 16, 17). Jedoch erkranken Männer altersadaptiert aufgrund der ansteigenden Inzidenz im Alter und der höheren Lebenserwartung von Frauen häufiger (18). Die 1-Jahres-Mortalitätsraten, in Deutschland 29 %, werden mit 20-40 % angegeben (11, 17, 18). Ein erniedrigter Karnofsky-Index als Maß der Einschränkung von Aktivität und Selbstversorgung sowie hohes Alter haben sich als Prädiktoren einer gesteigerten Mortalität erwiesen (17, 19). Darüber hinaus weisen Patienten mit einem niedrigen Karnofsky-Index höhere Anti-BP180 bzw. BP230 Antikörperspiegel auf (20). Zudem sind Patienten mit BP vermehrt von hämatologischen Malignomen betroffen (21).

2.2.2 Klinik

Der Verlauf der Erkrankung beginnt typischerweise mit wenig spezifischen Symptomen wie generalisiertem Juckreiz, erythematösen Hautveränderungen und urtikariellen Plaques. Diese prodromale Phase kann Wochen bis Monate andauern, wobei für einen geringen Anteil der Patienten keine weitere Manifestation der Erkrankung folgt (1). In der sich anschließenden bullösen Phase kommt es zur Bildung prall, serös gefüllter Blasen am gesamten Integument (Abb. 2). Prädilektionsstellen sind hierbei die Beugeseiten der Extremitäten, das Abdomen sowie die Intertrigines. Schleimhautveränderungen treten bei 10-20 % der Patienten auf (1, 22). Im weiteren Krankheitsverlauf rupturieren und entleeren sich die Blasen unter Krustenbildung

und nachfolgender postinflammatorischer hyper- und/ oder hypopigmentierter Abheilung ohne Narbenbildung (23). Ein unbehandeltes BP zeigt typischerweise einen rezidivierend-chronischen, schließlich selbstlimitierenden Verlauf. Eine spontane Remission kann innerhalb von Monaten spontan eintreten, bei der Hälfte der Patienten kommt es jedoch zu Rezidiven (24).

Diagnostisch bleibt im Rahmen der klinischen Untersuchung bei BP Patienten im Gegensatz zu Pemphigus Patienten die Bildung von Blasen durch tangentialen Druck bzw. Scherkräfte auf die Haut aus (Nikolski-I Phänomen negativ). Verbrennungen, Traumata, UV-Exposition, Strahlentherapie und Impfungen wurden in Koinzidenz mit dem Ausbruch der Erkrankung beschrieben (25). Als Maß der Ausprägung der Erkrankung und Instrument der Vergleichbarkeit neuer Behandlungsstrategien bietet der *Bullous Pemphigoid Disease Area Index* (BPDAI) ein bewährtes klinisches *Scoring*-System. Hiermit werden Erosionen/ Blasen, Erytheme/ Urtikaria und postinflammatorische Pigmentierungen an Haut und Schleimhäuten einzeln differenziert und unter Einbeziehung von Pruritus erfasst (26).



Abb. 2: Klinische Manifestation bei BP Patienten

Gruppirt stehende pralle Blasen der linken Axilla (li). Aufgeplatzte Blasen und Erosionen auf erythematöser Haut am linken Unterarm und Handgelenk (re).

2.2.3 Pathogenese

Unter der Vorstellung der autoimmunologischen Ätiologie des BP gelang Liu et al. in ihrem 1993 publizierten passiven Mausmodell der in-vivo Beweis für die maßgebliche Relevanz

BP180-spezifischer Autoantikörper für die Krankheitsentwicklung. Hierzu wurden die Antikörper eines mit rekombinanten murinen BP180 NC15A-immunisierten Kaninchens neonatalen Mäusen injiziert. Diese entwickelten daraufhin eine in klinischen, histologischen und immunologischen Aspekten dem BP vergleichbare Hauterkrankung (27). So zeigten die Tiere während der blasenbildenden Phase sowohl Komplement C3 Ablagerungen in der Basalmembranzzone als auch eine sukzessive Infiltration neutrophiler Granulozyten als Beginn der inflammatorischen Reaktion (27). Hierbei erfolgt über die Aktivierung des Komplement C5 Rezeptors (C5aR1) die Degranulation von Mastzellen (28, 29). Jedoch geht einer Blasenbildung initial nicht stets eine Komplementaktivierung voraus, sodass auch eine alternative Komplement-unabhängige Pathogenese des BP besteht. Eine besondere Rolle spielt diesbezüglich der direkte pathogenetische Effekt der NC16A Autoantikörper auf die Funktion des hemidesmosomalen Komplexes (30). So führt die Injektion von Anti-Kollagen 17 IgG Antikörpern in Komplement C5-negativen Mäusen lediglich zu einer Reduktion der Hautläsionen von 50 % sowie dermalen Neutrophileninfiltration im Vergleich zum Wildtyp (29). Auch im ex-vivo Verfahren konnte anhand eines Gefrierschnittmodells die wichtige pathogenetische Rolle der Anti-BP180 Autoantikörper gezeigt werden (31). Die Relevanz von Anti-BP180 Autoantikörpern ließ sich darüber hinaus aus der deutlichen Korrelation von Antikörperkonzentration und Krankheitsaktivität ableiten (32). Die pathogenetische Bedeutung von Anti-BP230 Antikörper konnte ebenfalls kürzlich in vivo nachgewiesen werden (33–34).

Als hemidesmosomale Proteine repräsentieren BP180 und BP230 die Autoantigene des BP. Beide fungieren als Zell-Matrix Adhäsionsmoleküle in der dermoepithelialen Junctionszone und dienen der Aufrechterhaltung der Integrität des Hautgewebes gegen externe Scherkräfte (35).

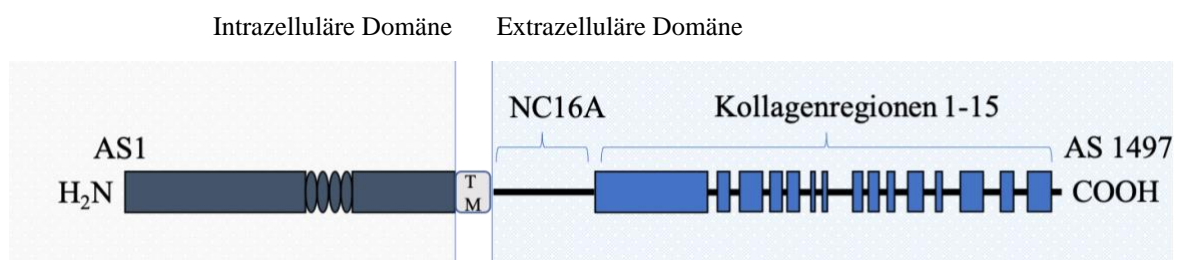


Abb. 3: Schematische Darstellung des humanen Kollagens XVII

Blaue Rechtecke repräsentieren die 15 kollagenen Regionen der extrazellulären Domäne und sind durch 16 nichtkollagene Domänen voneinander separiert. H₂N, N-Terminus; COOH, Carboxyl-Terminus; NC16A, immundominante Domäne des BP180; TM, transmembranöser Bereich.

BP180 mit einem Molekulargewicht von 180 kDa gehört zur Gruppe der Kollagene und bildet als transmembranöses Typ-II Glykoprotein einen essentiellen Bestandteil der hemidesmosomalen Struktur (36). Mit drei $\alpha 1$ -Kollagenketten aus jeweils ca. 1500 Aminosäuren bilden diese jeweils eine globuläre, intrazelluläre, N-terminale Domäne, einen kurzen transmembranösen Anteil und eine große extrazelluläre C-terminale Domäne (Abb. 3). Diese als Ektodomäne fungierende Teil besteht aus 15 Kollagensequenzen, welche untereinander durch 16 nichtkollagene (engl. *NC*) Subdomänen separiert werden und verläuft durch die Lamina lucida bis in die Lamina densa (37–38). Während die intrazelluläre Domäne über mehrere Bindungsstellen für hemidesmosomale Proteine wie Plektin, BP230 und $\beta 4$ von $\alpha 6\beta 4$ Integrin verfügt, ermöglicht die Ektodomäne Interaktionen mit $\alpha 6$ von $\alpha 6\beta 4$ Integrin und Laminin 332. Als das immundominante Autoantigen von BP180 gilt die extrazelluläre Region der 16. nichtkollagenen Domäne von BP180, auch NC16A genannt (35). Gegen diesen direkt an die Zellmembran angrenzenden Strukturabschnitt der Ektodomäne weisen bis zu 85 % der BP Patienten IgG Autoantikörper auf. Hierbei bilden IgG1 und IgG4 die prädominanten Subklassen dieser Autoantikörper, die sich bei vielen Patienten zusätzlich gegen intra- und extrazelluläre Bereiche außerhalb der NC16A Domäne richten (1, 39). Diese häufige Beobachtung bei Autoimmunerkrankungen wird als ‚*epitope spreading*‘ bezeichnet. Dieses im Verlauf der Erkrankung auftretende Phänomen beschreibt eine weitere Autoimmunisierung gegen ein zunehmendes Spektrum an Epitopen eines oder mehrerer Antigene (40).

BP230 (BPAG1e, auch Dystonin-e) liegt mit einer Größe von 230 kDa im inneren Bereich des hemidesmosomalen Plaques und gehört zur Plakin-Familie (41). Bei der Aufklärung der Zielantigene des BP war es das zuerst charakterisierte Autoantigen, bestehend aus einer globulären N-terminalen Domäne, einer zentral gelegenen *Coiled-Coil*-Struktur und einer globulären C-terminalen Domäne (42). Letztere bindet an Keratinfilamente, der N-Terminus ist mit BP180 und der $\beta 4$ -Kette des $\alpha 6\beta 4$ Integrins assoziiert (43). BP230 tritt bei 50-60 % der BP Patienten mit IgG Autoantikörpern im Serum als Autoantigen auf (44). Die immundominanten Epitope liegen im globulären C-terminalen Bereich (45). Darüber hinaus findet sich keine Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und der Anti-BP230 IgG Spiegel im Serum (46).

2.3 Schleimhautpemphigoid

2.3.1 Epidemiologie

Das Schleimhautpemphigoid (SHP) ist die zweithäufigste bullöse Autoimmundermatose in Zentraleuropa (47). Diese chronische, subepitheliale Autoimmunerkrankung zeichnet sich

durch den primären Befall der Schleimhäute aus (2). In Deutschland beträgt die Prävalenz 24,6/ Mio. Einwohner (3). Die Inzidenz der Erkrankung wird auf 1,3-2,0/ Mio. Einwohner/ Jahr in Frankreich und Deutschland geschätzt (8, 48). Vor allem die ältere Bevölkerung zwischen 60 und 80 Jahren erkrankt am SHP, wobei Frauen doppelt so häufig (2:1) betroffen sind wie Männer (49). Im Kindesalter tritt das SHP mit einer Prävalenz von 1,6/ Mio. Kinder selten auf (15).

2.3.2 Klinik

Das SHP kann sich an unterschiedlichen Lokalisationen manifestieren. Am häufigsten sind Mundhöhle (85 %) und Konjunktiven (65 %) betroffen (Abb. 4). Andere Manifestationsorte sind Haut (25-30 %), Nasenhöhle (20-40 %), perianale Region (20 %), Pharynx (20 %), Larynx (5-10 %), und Ösophagus (5-15 %) (50–52).



Abb. 4: Klinische Befunde bei SHP Patienten
Konjunktivale Injektionen, Symblepharon und Entropium des Unterlides am linken Auge.

Die Ausprägung des klinischen Bildes ist variabel und reicht von dezenten oralen Läsionen und konjunktivaler Injektion bis zu äußerst schmerzhaften Schleimhautdefekten, ösophagealen Strikturen oder Erblindung. Bei okulärer Beschränkung der Erkrankung spricht man von okulärem Pemphigoid (50–52). Die von den subepidermalen Blasen und Läsionen betroffenen Gewebeareale vernarben, wohingegen die Abheilung der Mundschleimhaut ohne Narbenbildung verläuft (53).

Das SHP wird bislang mit drei genetischen Varianten des humanen Leukozytenantigen (HLA) bzw. dem Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (HLA-DQB1*0301, DRB*04 sowie DRB*11) in Verbindung gebracht (51, 54–57). Weitere prädisponierende Genloci konnten in

β -Galaktocerebrosidase (GALC) und zwischen *CASC16* und *CHD9* identifiziert werden (58). Darüber hinaus weisen Patienten mit einer Autoantikörperreaktivität gegen multiple BP180 Epitope eine erhöhte Krankheitsaktivität auf (59). Vergleichbar zum BP leiden SHP Patienten mitunter an weiteren Autoimmunerkrankungen, vor allem der Schilddrüse (14). Da bei 30 % der Anti-Laminin 332 SHP Patienten maligne Tumore wie Magen-, Gebärmutter-, Lungen- und Kolonkarzinome festgestellt wurden, kann von einer Malignomassoziation der Erkrankung ausgegangen werden. Diese Feststellung macht eine frühzeitige und präzise Diagnosestellung obligat (60–62).

2.3.3 Pathogenese

Auch heute noch sind viele Zusammenhänge von Ursachen und pathogenetischen Mechanismen des SHP ungeklärt. Unzweifelhaft konnte jedoch die Pathogenität spezifischer Autoantikörper sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden. So ließen sich durch passiven Transfer von Anti-Laminin 332 IgG in Mäuse subepidermale Blasen der Haut und Mundschleimhaut auslösen und das typische klinische, histologische und immunpathologische Krankheitsbild hervorrufen (63). Die Pathogenese definiert sich daher grundsätzlich über eine Autoreaktivität der im Patientenserum zirkulierenden IgG und IgA Autoantikörper gegen Strukturen der Basalmembran (64, 65). Vergleichbar zum BP gilt auch beim SHP unter den IgG Antikörpern die Subklasse 4 als prädominant (66). Die im Rahmen der humoralen Immunantwort stimulierte Produktion von Autoantikörpern und Aktivierung des Komplementsystems führt schließlich zur Freisetzung von Zytokinen und Proteasen aus aktivierten Entzündungszellen und inflammatorisch-zytotoxischen Schädigung mit Ablösung des Epithels unter Bildung von subepidermaler Blasen mit Separation der Basalzellen von der Basalmembran (67).

Die Besonderheiten dieser Erkrankung liegen in der Diversität der identifizierten Autoantigene, hierbei bildet BP180 mit 75 % der Fälle das Hauptautoantigen, welches sich in 25 % gepaart mit einer Reaktivität gegen BP230 findet (47). Laminin 332 (25 %) und Laminin 311, beide Untereinheiten von $\alpha 6\beta 4$ Integrin und Typ VII Kollagen stellen weitere wesentliche Antigene des SHP dar (54, 68–70). Die Affinität der BP180-reaktiven SHP Seren weist dabei zu Seren des BP signifikante Unterschiede im Spektrum der Autoantigenität auf (71). So ist die NC16A Domäne im Gegensatz zu BP Patienten nur von 50 % der BP180-reaktiven SHP Seren betroffen. Zudem handelt es sich bei den betroffenen Epitopen um sowohl zentrale als auch C-terminale Bereiche der BP180 Ektodomäne am Übergang zwischen Lamina lucida und Lamina

densa (54, 69, 72, 73). Ein Drittel der BP180-reaktiven SHP Seren reagieren zusätzlich an intrazelluläre Bereiche des hemidesmosomalen Proteins (69).

Auch die Gruppe der Laminine weist verschiedene immundominante Epitope auf. Laminin 332 als heterotrimeres Protein besteht aus jeweils einer α -, β - und γ -Kette und befindet sich zwischen unterer Lamina lucida und oberer Lamina densa. Zusammen mit der BP180 Ektodomäne ist Laminin 332 zentraler Bestandteil des hemidesmosomalen Haftkomplexes und weist Bindungsstellen zu BP180 und über die β 3-Kette zu Kollagen VII auf (74–76). Darüber hinaus bindet Laminin 332 über die α 3-Kette die Oberflächenrezeptoren α 3 β 1, α 6 β 4 und α 6 β 4 Integrin sowie Syndecan-1 und Syndecan-4 (77, 78). Bei SHP weist ein Viertel der Patientenserum Autoantikörper gegen Laminin 332 auf. In einer Kohorte von 93 Anti-Laminin 332 SHP Patienten zeigten sich Sensitivitäten von 77, 43, 41 bzw. 13 % gegen heterotrimeres Laminin 332, α 3-, β 3- bzw. γ 2-Untereinheit mittels indirekter Immunfluoreszenz (62).

Integrine gehören zur Familie der Zelloberflächenrezeptoren und bestehen als Heterodimere aus je einer α - und β -Untereinheit. α 6 β 4 Integrin ist ein Transmembranprotein in der dermoepidermalen Junctionszone (74). Die Ektodomäne der α 6-Untereinheit weist Bindungsstellen für die Ektodomäne von BP180, CD151 und Laminin 332 auf (79, 80). Dagegen interagiert die β 4-Untereinheit intrazellulär mit Plektin, BP180 sowie BP230 und extrazellulär mit der Laminin 332 α 3-Kette (81–83). Autoantikörper gegen α 6 β 4 Integrin werden bei SHP Patienten in weniger als 5 % nachgewiesen (1). Bei Patienten mit Autoantikörpern gegen α 6 Integrin zeigen sich orale Läsionen, wohingegen bei Reaktivität gegen β 4 Integrin ein okulärer Befall der Erkrankung beobachtet wird (84). In welcher Weise noch nicht identifizierte Autoantigene zur Klärung von Pathogenese und Diagnostik des heterogenen Krankheitsbildes des SHP beitragen können, ist offen (85).

2.4 Diagnostik des BP und SHP

Die entscheidende Bedeutung einer frühen wie präzisen Diagnose für Patienten mit bullösen Autoimmundermatosen ergibt sich aus der überlebenswichtigen Bedeutung wesentlicher Unterschiede in Krankheitsverlauf, Therapieansatz, assoziierten Erkrankungen und Prognose. Da eine sichere Differenzierung des BP und SHP durch die ausschließliche Betrachtung klinischer Charakteristika (s. 2.2.2. und 2.3.2.) nicht möglich ist, bleibt die Diagnose nur unter Einbeziehung histopathologischer, immunologisch-serologischer wie möglicherweise zukünftiger molekulargenetischer Untersuchungen zu stellen (2, 9).

So zeigt die Histopathologie einer läsionalen Hautprobe (Abb. 5) bei beiden Erkrankungen eine subepidermale Blasenbildung mit Infiltration, zunächst eosinophiler und neutrophiler Zellen, gefolgt von einer makro- und lymphozytären Invasion in die papilläre Dermis (47).

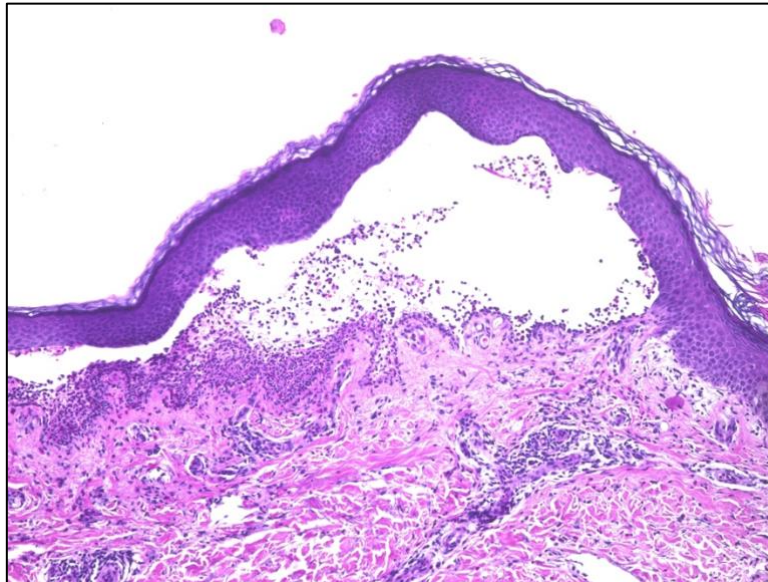


Abb. 5: Histopathologisches Bild des BP

Blase mit zahlreichen eosinophilen Granulozyten innerhalb und unterhalb des Blasenlumens, 100-fache Vergrößerung (HE-Färbung).

Als diagnostischer Goldstandard gilt in diesem Zusammenhang die direkte Immunfluoreszenz (DIF, Abb. 6) an periläsionalen Hautproben mit einer Sensitivität von 82-91 % und einer Spezifität von 98 % (9, 86–88). In diesen weisen eine lineare Ablagerung von IgG oder IgA Antikörpern sowie häufig auch Komplementfaktor C3 an der dermoepithelialen Junctionszone (DEJ) auf das Vorliegen eines BP oder SHP hin (1). Es kann zwischen intradermalen Pemphiguserkrankungen und subepidermalen Autoimmundermatosen, sowie zwischen IgG- (BP, SHP, Pemphigoid gestationis und Epidermolysis bullosa acquisita) und IgA-vermittelten Autoimmundermatosen (Dermatitis herpetiformis und lineare IgA-Dermatose) differenziert werden. Eine Unterscheidung zwischen BP und SHP lässt die Technik der DIF jedoch nicht zu (1, 9, 87).

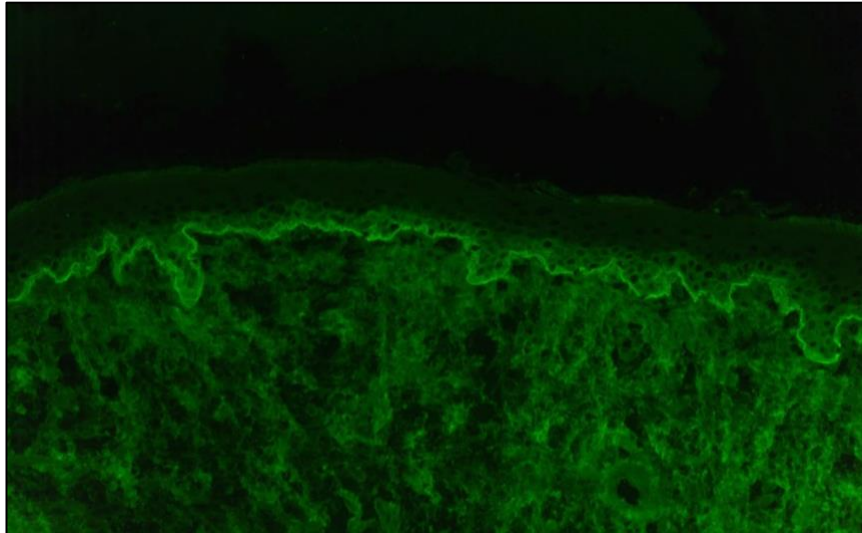


Abb. 6: Direkte Immunfluoreszenz eines BP Patienten

Lineare Ablagerung von IgG an der Basalmembran einer perilesionalen Hautprobe. 200-fache Vergrößerung.

In der serologischen Diagnostik wird zur Detektion und Differenzierung zirkulierender Autoantikörper die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) genutzt (Abb. 7). Darüber hinaus stellen Immunblotassays und antigenspezifische *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) als antikörperbasierte Nachweisverfahren weitere Differenzierungsmöglichkeiten dar.

Für die IIF dient ein humanes Hautpräparat als Substrat, nach Spaltung durch 1 M Natriumchlorid (NaCl) Lösung. So können die an die Antigene gebundenen Autoantikörper mit Hilfe eines fluoreszierenden Zweitantikörpers gegen humanes IgG/ IgA angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch als lineare Ablagerung am artifizialen Blasendach identifiziert werden (89). Die epidermal angefärbten Proteine BP180, BP230 und $\alpha 6\beta 4$ Integrin repräsentieren hier die Autoantigene von BP, Pemphigoid gestationis, linearer IgA-Dermatose und BP180-Typ SHP und lassen sich mit einer Sensitivität von 73–96 % und eine Spezifität von 97 % für BP Seren nachweisen (86, 90, 91). Im Fall des SHP sind Antikörper durch IIF in nur 50 % nachweisbar (92). Ebenfalls bleibt in der Hälfte der Fälle der Patienten die IIF negativ bzw. in nur niedrigen Titern hinweisend auf die vorliegende Erkrankung (69, 93, 94).

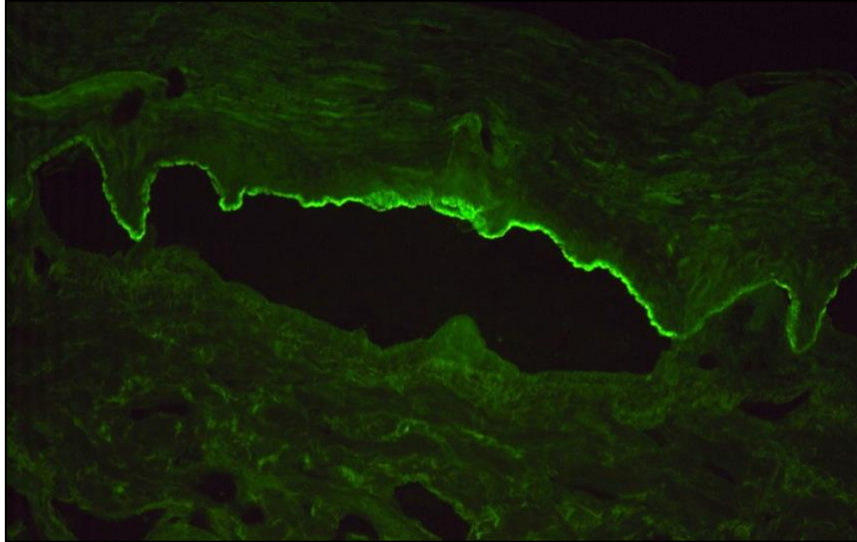


Abb. 7: Indirekte Immunfluoreszenz eines BP Patienten

Die linearen IgG Ablagerungen sind auf humaner Spalthaut am artifiziellen Blasendach nach Inkubation mit einem BP Serum erkennbar. 200-fache Vergrößerung.

Zur exakten Differenzierung der antikörperreaktiven Autoantigene der verschiedenen Strukturen der dermoepithelialen Junktionszone werden kommerziell erhältliche ELISA Systeme mit Epitopen von BP180 oder BP230 (kombiniert) eingesetzt. Darüber hinaus stehen heute auch BP180 ELISA mit dem immundominanten BP Epitop NC16A zur Verfügung. Mit diesen von wenigen internationalen Laboratorien (Euroimmun, Lübeck; MBL, Nagoya, Japan) angebotenen ELISA Verfahren erreicht die Nachweisbarkeit des BP eine Sensitivität von 84-89 % mittels BP180 und 60-70 % mit BP230 (95–98). Der Nachweis von BP180-spezifischen SHP Seren gelingt durch den NC16A ELISA zu 50 % (99).

Als weitere diagnostische Methode zum Nachweis BP180-spezifischer C-terminaler Antikörper in BP und SHP Patientenserum wurde das Immunblotting der löslichen BP180 Ektodomäne, LAD-1, etabliert (100). Dieser Immunblot wurde einst zum Nachweis der linearen IgA-Dermatose eingeführt. Als Substrat repräsentiert das LAD-1 das immundominante Autoantigen der linearen IgA-Dermatose (100). Der LAD-1 Immunblot (s. 4.2.2.1) hat sich bei BP180-spezifischen NC16A-negativen BP und SHP Seren als präzisierende Ergänzung der Diagnostik erwiesen, dessen Sensitivität von BP IgG Antikörpern nach interner Durchführung des Lübecker Autoimmunlabor zwischen 60-70 % und laut Kromminga et al. mit 74 % beschrieben wird (101). Dagegen zeigen LAD-1 Immunblots mit SHP Seren eine Sensitivität für IgA und IgG Autoantikörper von nur 37 % bzw. 16 % (69). Die Spezifität für IgG und IgA Autoantikörper erreicht im Lübecker Labor 95 % bzw. 88 %. Die Differenzierung der

möglichen identischen Konstellation von Autoantikörperreaktivität der Entitäten des BP und SHP bleibt weiterhin auf klinische Expertise angewiesen.

2.5 Fragestellung

ELISA Systeme ermöglichen die Diagnose BP180-spezifischer NC16A-positiver BP und SHP Seren, existieren bislang jedoch nicht für weitere BP180 Domänen als Zielantigene autoimmunologischer Reaktivität. Zur diagnostischen Differenzierung von BP180-spezifischen NC16A-negativen BP sowie SHP Seren gilt der LAD-1 Immunblot bislang als Methode der Wahl. Dieses Verfahren zeigt jedoch wesentliche Schwächen: Nicht nur eine ungenügende Sensitivität, sondern auch die mangelnde Reproduzierbarkeit, ein hoher methodischer Aufwand (s. 4.2.2.1) und die unzureichende Effizienz schränken den Nutzen des LAD-1 Immunblots für die Diagnostik der bullösen Autoimmundermatosen ein.

Somit ergibt sich im Hinblick auf die Entwicklung einer zuverlässigen serologischen Diagnosestellung für eine derzeit nicht unerhebliche Zahl betroffener BP und SHP Patienten die Zielsetzung dieser Arbeit:

- 1) Die Optimierung des Nachweises von Autoantikörpern gegen C-terminale Epitope von BP180.
- 2) Die Untersuchung von Patientenseren anhand der neu generierten Fragmente als standardisierte Epitope der BP180(EK) für eine spätere kommerzielle Testentwicklung.
- 3) Die Bewertung der Substrate bezüglich ihrer diagnostischen Zuverlässigkeit zur Diskriminierung beider Krankheitsentitäten.

3. MATERIAL

3.1 Geräte

Tabelle 1: Übersicht der Geräte und Hilfsmittel	
Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Chemikalienschrank CaptAir Store	Erlab, Köln
Computer <i>optiplex GX620</i>	Dell Technologies, Round Rock, Texas, USA
Detektionsgerät <i>Glomax Discover</i>	Promega, Fitchburg, USA
Drucker <i>P93D</i>	Mitsubishi, Minato, Tokio, Japan
Eiskegelbereiter	Scotsman Industries Inc, Vernon Hills, Illinois
Elektrophoresekammer <i>Mini Protean II</i>	BIO-RAD Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Eppendorf <i>Research</i>	Eppendorf, Hamburg
Geräteammersystem für Gelelektrophorese	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Heizblock <i>Thermostat</i>	BioSan, Riga, Lettland
Nano-Photometer <i>Nanodrop</i>	Implen, München
pH Meter <i>pH526</i>	WTW, Weilheim
Photometer <i>Biophotometer</i>	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe <i>accu-jet</i>	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe <i>pipetus-junior</i>	Hirschmann, Eberstadt
Pipettierhilfe <i>pipetus-reddot</i>	
Rotator	neoLab Migge, Heidelberg
Rotator	Snijders, Tilburg, Niederlande
Rührer <i>UC151</i>	Stuart, Staffordshire, Großbritannien
Schüttelgerät <i>Duomax 1030</i>	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttelgerät <i>Vortex Genie 2</i>	Scientific Industries, New York, USA
Schüttelinkubator <i>MaxQ4000</i>	Thermo Scientific, Schwerte
Schüttler <i>MR3002</i>	Heidolph Instruments, Schwabach
Spannungsquelle <i>Electrophoresis Power Supply-EPS 3500</i>	Intertek Semko AB, Kista, Schweden

Spannungsquelle <i>PeQPower 250</i>	VWR Life Science Competence Center, Erlangen
Spannungsquelle <i>POWER PAC 200</i>	BIO-RAD Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Sterile Werkbank <i>Captair chem</i>	Erlab, Köln
Ultraschall Homogenisator <i>Sonopuls</i> (HD und UW 2070)	Bandelin electronic, Berlin
UV Transilluminator	Vilber, Eberhardzell
Waage <i>Precision Standard</i>	OHAUS, Parsippany, New Jersey, USA
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen
Wasserbad Zellkultur (<i>Lauda Aqualine</i> , Typ <i>AL5</i>)	LAUDA, Lauda-Königshofen
Zentrifuge <i>Avanti® J-E</i>	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge <i>Centrifuge 5804 R</i>	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge <i>Centrifuge 5810 R</i>	
Zentrifuge <i>Sigma 1-14</i>	Sigma, Osterode am Harz
Zentrifuge Zellkultur <i>Heraeus Megafuge</i>	Kendro Laboratory Products, Hamburg

3.2 Verbrauchsprodukte

Tabelle 2: Übersicht der Verbrauchsprodukte	
Bezeichnung	Hersteller
Amicon® Ultra 15 mL Centrifugal Filter (10 k, 30 k NMWL)	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Amicon® Ultra 50 mL Centrifugal Filter (10 k, 30 k NMWL)	
Chromatographie Papier	A. Hartenstein, Würzburg
Cryo-Röhrchen	Biosigma, Cona, Venedig, Italien
DAB Puffer Tabletten	Merck, Darmstadt
ELISA Platten <i>Nunc-Immuno Plate</i>	Thermo Scientific, Rockford, Illinois USA
Filtermembran <i>MF Membrane Filters</i>	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Handschuhe <i>Peha-Soft (powderfree, nitrile)</i>	Hartmann, Heidenheim
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht

Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, Amersham, Großbritannien
Parafilm <i>Laboratory Film</i>	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, Wisconsin, USA
Pipettenpsitzen <i>Gelloader</i>	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen <i>Biosphere Filter Tips</i>	
Polypropylen Säulen (5 mL)	QIAGEN, Venlo, Niederlande
Reaktionsgefäße <i>Low Binding Microtubes</i>	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße <i>PCR Soft Tubes</i> , 0,2 mL	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Reinigungstücher <i>WYPALL</i>	Kimberly Clark, Irving, Texas, USA
Röntgenfilme <i>FUJI medical X-Ray Films</i>	Fujifilm, Minato, Tokio, Japan
SafeSeal Gefäß (1,5 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Spin Columns <i>Pierce</i>	Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA
UV-Küvetten halbmikro (1,5 mL)	Brand, Wertheim
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugengefäße (versch. Größen)	

3.3 Verwendete Kits

Tabelle 3: Übersicht der Kits	
Bezeichnung	Hersteller
BCA Protein Assay Kit <i>Pierce</i>	Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA
<i>ECL Prime Immunoblotting Detection Reagent</i>	GE Healthcare, Amersham, Großbritannien

3.4 Reagenzien

Tabelle 4: Übersicht der Reagenzien	
Bezeichnung	Hersteller
30 % Acrylamid / BIS Solution	BIO-RAD Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	Hauseigene Herstellung
Coomassie Brilliant Blue <i>G-250</i>	BIO-RAD Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA

EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat)	Merck, Darmstadt
Ethanol (70 % vergällt)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz Dihydrath	
FBS (Fetal Bovine Serum)	Biochrom, Berlin
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	
Guanidin-Hydrochlorid	
<i>jetPRIME</i> ® Transfektionsreagenz	Polyplus, Illkirch, Frankreich
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	
Natriumchlorid (NaCl)	
PMSF (Phenylmethylsulfonyl-Fluorid 99 %)	AppliChem, Darmstadt
Polysorbat-20, <i>Tween 20</i>	SIGMA-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Proteinfärbelösung <i>PageBlue</i>	Thermo Scientific, Rockford, USA
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe
T-175cm ² Zellkulturflasche	Tissue Culture Flask T75, Sarstedt, Nümbrecht
T-75cm ² Zellkulturflasche	
TALON <i>Metal Affinity Resin</i>	Takara Holdings, Kyoto, Japan
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Elektrophoresereagenz	
Triphenylmethanfarbstoff, Fast Green	
Tris Base	Serva, Heidelberg
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Vitamin C (L-Ascorbinsäure)	
Wasserstoff-Peroxid	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	

3.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 5: Übersicht der Lösungen und Puffer		
Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendungszweck
10x PBS Puffer (5 L)	450 g Natriumchlorid, 87 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 9 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, auffüllen mit Aqua dest.	Proteinexpression
10x Transferpuffer (2 L)	288,26 g 1,92 M Glycin, 60,6 g 0,25 M Tris-Base, auffüllen mit Aqua dest.	Immunblot
5x Laufpuffer (1 L)	15 g Tris-Base, 72 g Glycin, 5 g SDS-Pellets, auffüllen mit Aqua dest.	SDS-PAGE
5x SDS	25 mL Tris pH 6,8, 12 g SDS,	
Probenpuffer (Lämmli-puffer)	60 mL Glycerol, 13 mL Aqua. dest., 0,2 % Bromphenol Blau, 37,3 mL β -Mercaptoethanol	
5x TBST (pH 7,5) (1 L)	12,1 g Tris-Base, 40 g NaCl, 5 mL Tween 20, auffüllen mit Aqua dest.	Immunblot
APS Lösung (10 %)	10 % APS (% w/ v), auffüllen mit ddH ₂ O	SDS-PAGE
Blockierpuffer (5 %)	5 % Milchpulver (% w/ v), 1x TBST	Immunblot
Blockierpuffer (8 %)	8 % Milchpulver (% w/ v), 1x TBST	
BSA Puffer (1 %)	1 % Albumin Fraktion V (v/ v), 1x TBST	
<i>Euroimmun</i>	10x konzentriert	
Waschpuffer <i>plus</i>		
Fast Green (500 mL)	0,5 g Fast Green, 50 mL Methanol, 25 mL Essigsäure, auffüllen mit Aqua dest.	
Inkubationspuffer (100 mL)	5 % Milchpulver (% w/ v), 1 % Albumin Fraktion V (v/ v), 1x TBST	
Lysepuffer	50 mM Tris HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton-X-100, (<i>CellLytic M</i> Detergens)	Transfektion, Aufreinigung
MES Puffer (1 L)	3,9 g 2-(N-Morpholino) Ethansulfonsäurer (MES), auffüllen mit Aqua dest.	His-Tag Proteinaufreinigung

RIPA Puffer (100 mL)	1 mL NP40, 5 mL Natrium-Deoxycholat, 1 mL 10 % SDS und 1x Protease-Inhibitor Tablette, auffüllen mit PBS	Immunpräzipitation
TALON Elutions- puffer (pH 7.0)	6,2 g 45 mM Natriumphosphat, 515,86 g 5,4 mM Guanidin-HCL, 15,8 g 270 mM NaCl, 10,2 g 150 M Imidazol, auffüllen mit Aqua dest.	His-Tag Proteinaufreinigung
TALON Regenerationspuffer (1 L)	573,18 g Guanidin-HCL, 5 mL Triton-X- 100, auffüllen mit Aqua dest.	
TALON Waschpuffer (denaturierend)	6,88 g 50 mM Natriumphosphat, 573,18 g 6 M Guanidin-HCL, 17,5 g 300 mM NaCl, auffüllen mit Aqua dest.	
QC Waschpuffer	1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % Isopropanol (v/ v)	DNA Plasmidaufreinigung
QF Elutionspuffer	1,25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 8,5, 15% Isopropanol (v/ v)	

3.6 Gele/ Agarplatten

Tabelle 6: Übersicht der Gele und Agarplatten	
Bezeichnung	Zusammensetzung
Agarplatten	500 mL Aqua dest., 4 LB-Medium Kapseln - 15 g Agar-Agar - 500 µL aus 0,1 mg/ mL Carbencillin
SDS Sammelgel (4 %)	Aqua dest. 3 mL, 0,5 M Tris pH 6,8 1,25 mL, 30 % Acrylamid 670 µL, 10 % SDS 50 µL, TEMED 12 µL, 10 % APS 70 µL
SDS Sammelgel (4 %)	Aqua dest. 3,1 mL, 0,5 M Tris pH 6,8 700 µL, 30 % Acrylamid-bis (49:1) 650 µL, 100 % Glycerol 250 µL, 0,5 M EDTA pH 8 40 µL, 10 % SDS 200 µL, TEMED 12 µL, 10 % APS 70 µL

SDS Trenngel (12 %)	Aqua dest. 3,42 mL, 1,5 M Tris pH 8,8 2,5 mL, 30 % Acrylamid 3,96 mL, 10 % SDS 100 µL, TEMED 12 µL, 10 % APS 50 µL
SDS Trenngel (6 %)	Aqua dest. 5,38 mL, 1,5 M Tris pH 8,8 2,5 mL, 30 % Acrylamid 2 mL, 10 % SDS 100 µL, TEMED 12 µL, 10 % APS 50 µL
SDS Trenngel (7,5 %)	Aqua dest. 4,15 mL, 1,5 M Tris pH 8,8 1,35 mL, 30 % Acrylamid-bis (49:1) 2,5 mL, 100 % Glycerol 500 µL, 1 M Glycin 1 mL, 10 % SDS 400 µL, TEMED 12 µL, 10 % APS 150 µL
SDS Trenngel (8 %)	Aqua dest. 4,71 mL, 1,5 M Tris pH 8,8 2,5 mL, 30 % Acrylamid 2,67 mL, 10 % SDS 100 µL, TEMED 12 µL, 10 % APS 40 µL

3.7 Enzyme

Tabelle 7: Übersicht der Enzyme				
Bezeichnung		Hersteller		Verwendungszweck
Protease Inhibitor Cocktail		Merck, Darmstadt		Inhibition von Proteasen
<i>cOmplete miniTM</i>				
Protease Inhibitor Cocktail		Merck, Darmstadt		
Set III, tierfrei				

3.8 Vektoren

3.8.1 Plasmide

Tabelle 8: Übersicht der Plasmide	
Bezeichnung	Hersteller
BP180-pcDNA3	Von Dr. C. Hammers bereitgestellt (102)

3.9 Proteine

Tabelle 9: Übersicht der Proteine BP180(EK) und BP180(EK) Fragmente	
Bezeichnung	Hersteller
ZÜ569; HEK293T-sp(1)-BP180(EK) (AS 489-1497)	Euroimmun, Lübeck
ZÜ2631; HEK293T-BP180(EK)-1 (AS 563-807)	
ZÜ2632; HEK293T-BP180(EK)-2 (AS 793-1039)	
ZÜ2633; HEK293T-BP180(EK)-3 (AS 1024-1270)	
ZÜ2638; HEK293T-BP180(EK)-4 (AS 1255-1497)	

3.10 Antikörper

Tabelle 10: Übersicht der Antikörper	
Bezeichnung	Hersteller
AP (Alkaline Phosphatase) konjugiert mit Ziegen-Anti-Human IgG Antikörper	Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA
Monoklonaler Kaninchen Anti-Human Collagen XVII Antikörper <i>EPR18614</i>	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Monoklonaler Maus Anti-His-Tag IgG/ HRP Antikörper	Merck, Darmstadt
Monoklonaler Maus-Antikörper kovalent an Agarose <i>ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Polyklonaler Kaninchen Anti-Human IgG/ HRP Antikörper	Dako, Hamburg
Polyklonaler Kaninchen Anti-Maus IgG/ HRP Antikörper	
Polyklonaler Ziegen Anti-Kaninchen IgG/ HRP Antikörper	

3.11 Probenmaterial

3.11.1 Patientenseren

Die Arbeit basiert auf Analysen an Aliquoten anonymisierter Patientenseren. Die Einschlusskriterien der Patienten mit BP und SHP umfassten (I) das vereinbare klinische Bild; (II) die Reaktivität mit der löslichen Ektodomäne (LAD-1) von BP180 und (III) die fehlende Reaktivität mit BP180 NC16A im ELISA. Außerdem wurden die Seren gesunder Freiwilliger (n =54) als Negativkontrollen eingesetzt. Die verwendeten Seren wurden bis zur Verwendung bei -20 °C (BP) bzw. -80 °C (SHP) eingefroren. Nach Beginn der Verwendung der Seren erfolgte die Lagerung bei 4 °C. Die Verwendung der Seren erfolgte im Einklang mit der Erklärung von Helsinki und nach Begutachtung der Studie durch die Ethikkommission (12-178).

3.11.2 Zelllinien

Die nachfolgenden Zelllinien (siehe Tab. 11) wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit für Transfektionsexperimente oder zur Gewinnung von Proteinextrakten verwendet.

Tabelle 11: Übersicht der Zelllinien		
Bezeichnung	Zulieferer	Verwendungszweck
HaCaT Zellen	Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg	LAD-1 Isolation
HEK293 Zellen	Euroimmun, Lübeck	BP180 Expression

3.11.3 Bakterienstämme

Tabelle 12: Übersicht der Bakterienstämme		
Zellstamm	Genotyp	Verwendungszweck
<i>E. coli</i> Nova blue	endA1 hsdR17 (rK12 ⁻ mK12 ⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F ⁺ [proA ⁺ B ⁺ lacI ^q ZΔM15: Tn10](Tet ^R)	Plasmidproduktion

3.12 Medien

Tabelle 13: Medium zur Anzucht von prokaryotischen Zellen	
Bezeichnung	Hersteller
<i>Luria-Bertani</i> , Kapseln	MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA

Tabelle 14: Medien zur Anzucht von eukaryotischen Zellen	
Bezeichnung	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose	Merck, Darmstadt
Keratinocyte Growth Medium 2	PromoCell, Heidelberg

4. METHODEN

4.1 Arbeiten mit Bakterien

4.1.1 Transformation kompetenter Bakterien

Unter Transformation ist die Integration rekombinanter DNA in das genetische Repertoire eines Bakterienstammes zu verstehen. Hierzu wurde im vorliegenden Fall ein mir zur Verfügung gestelltes Plasmid in z-kompetente *Escherichia coli Nova Blue* (*E. coli Nova Blue*) eingebracht. Die bereits durch Vorbehandlung mit *Mix & Go E. coli Transformation Kit & Buffer Set* von ZymoResearch kompetenten Bakterien wurden als Suspension von jeweils 30 µL unter Zusatz von 1 µL des BP180-pcDNA3 Plasmids auf Carbenicillin-haltigen LB Luria (Bertani-) Agarplatten ausgestrichen. Nach 12-stündiger Inkubation bei 37 °C über Nacht standen diese zur Anzucht für eine Plasmidpräparation bereit.

4.1.2 Extraktion des Plasmids

Nach Amplifikation des BP180(VL) Plasmids in Bakterienzellen mittels *Qiagen Plasmid Maxi Kit* (10) erfolgte die Isolierung der Plasmid DNA nach Angaben des Herstellers. So wurde der Inhalt einer Übernachtskultur in vier 50 mL Röhrchen gefüllt und bei 2700x g und bei 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in jeweils 10 mL P1 Puffer resuspendiert (enthält RNase) und anschließend mit jeweils 10 mL P2 Puffer versetzt. Nach Lyse der Zellen über 5 Minuten erfolgte die 20-minütige Präzipitation der DNA und kleiner Zellbestandteile durch Zugabe von P3 Puffer. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 20 000x g für 30 Minuten bei 4 °C wurde der Plasmid DNA-enthaltende Überstand auf die schon zuvor äquilibrierte Säule gegeben. Unter Fraktionierung der Flüssigkeit durch Sedimentation wurde die Matrix zweimal mit 30 mL QC Puffer gewaschen, die DNA mit 15 mL QF Puffer eluiert und dieses anschließend mit Isopropanol präzipitiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurde die DNA in 70 % Ethanol gewaschen und als plasmid-enthaltendes Präzipitat luftgetrocknet. Abschließend wurde dieses in 800 µL Aqua dest. aufgenommen und die Konzentration mittels Nanodrop gemessen.

4.2 Zellbiologische Verfahren

4.2.1 HaCaT Zelllinie

Die humane Keratinozyten Zelllinie HaCaT Zellen (*Human Adult Low Calcium High Temperature Keratinocytes*) wurde in *Keratinocyte Growth Medium 2* (PromoCell GmbH, Heidelberg) kultiviert und nach jeweils 72 Stunden unter Verwendung von Trypsin passagiert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte durch einen Technischen Assistenten unter der Aufsicht von Dr. Stephanie Goletz.

4.2.2 Proteinextrakte aus HaCaT Zellen

4.2.2.1 LAD-1

Autoantikörper gegen LAD-1 (Lineare IgA-Dermatose Antigen-1) gelten als wegweisender diagnostischer Indikator bei Patienten mit BP, SHP und linearer IgA-Dermatose. Zum Nachweis humaner IgG und IgA Autoantikörper gegen LAD-1 wird allgemein das Immunblotverfahren (Westernblot) als Referenzmethode eingesetzt. Dies gilt auch für die weiteren, modifizierten Formen spezifischer Immunblots dieser Arbeit, welche sich auf die Detektion spezifischer IgG Autoantikörper in Seren von Patienten mit BP und SHP fokussiert.

Die zunächst erforderliche Isolierung der 120 kDa-schweren löslichen Ektodomäne (LAD-1) erfolgte aus dem Konzentrat des konditionierten konzentrierten Mediums kultivierter humaner Keratinozyten (100). Hierzu wurden HaCaT Zellen bis zu einer 80 %igen Konfluenz bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und anschließend unter Zusatz von 25 µL Vitamin C in 25 mL Medium auf T-175 cm² Zellkulturflaschen verteilt. Nach 48 Stunden wurde der Zellüberstand in 50 mL Röhren überführt und für 10 Minuten bei 4 °C und 1000 rpm zentrifugiert. Jeweils 50 mL des Überstands wurden mit 500 µL 0,5 M EDTA und 500 µL 0,1 M PMSF versetzt und bei -20 °C gelagert.

Um die 120 kDa-abgespaltene Ektodomäne von BP180 (LAD-1) zu erhalten, wurden 900 mL des eingefrorenen Keratinozytenüberstandes aufgetaut und einer Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Dazu wurde der Überstand mit 158,4 g gemörsertem Ammoniumsulfat versetzt, anschließend das Protein über Nacht unter Rühren bei 4 °C gefällt und nach einer Zentrifugation bei 17000x g (4 °C für 90 Minuten) als Pellet in PBS und Protease Inhibitor resuspendiert. Abschließend erfolgte die Aufkonzentration des Extraktes mittels *Amicon*®-Filtern.

4.2.2.2 Extrazelluläre Matrix

Die Herstellung der extrazellulären Matrix (EZM) erfolgte durch HaCaT Zellen. Sowohl Laminin 332 als auch BP180 gehören als Bestandteile zur EZM. Da der Immunblot des Extraktes der EZM ausschließlich für IgG4 etabliert ist, lässt sich dieser bei der Frage nach der dominanten Immunglobulin-Subklasse der zu untersuchenden Erkrankungen nutzen. Die Herstellung des mir für diese Arbeit zur Verfügung gestellten EZM Extraktes erfolgte im Autoimmunlabor der Dermatologie der Universität zu Lübeck und lief wie folgt ab: Zunächst

erfolgte die Kultivierung von HaCaT Zellen wie bereits beschrieben. Die Überstände von sechs konfluenten T-175cm² Zellkulturflaschen wurden abgesaugt und dreimal mit PBS gewaschen. Nach Devitalisierung der Zellen durch eine Ammoniaklösung und Waschen mit Aqua dest. wurde unter Zugabe von Lämmli-puffer die anhaftende EZM mittels Zellschaber gewonnen. Abschließend erfolgte eine fünfminütige Hitzedenaturierung bei 95 °C und die Lagerung des Substrates bei -80 °C.

4.2.3 HEK293 Zelllinie

HEK293 Zellen (*Human Embryonic Kidney* Zelllinie) wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (*high glucose*) kultiviert. Das Nährmedium wurde mit 10 % (v/ v) fötalem Kälberserum (FBS, Biochrom, Berlin, Deutschland), 100 µg/ mL Streptomycin und 100 µg/ mL Penicillin versetzt und die Zellen alle 2 bis 3 Tage passagiert.

4.2.4 Transfektion der HEK293 Zellen mit BP180-pcDNA3

Die Transfektion der HEK293 Zellen wurde nach Erreichen einer Konfluenz von 60-70 % mit Hilfe von *jetPRIME*[®] *transfection reagent* (Polyplus) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurde nach Lösung der DNA in *jetPRIME*[®] Puffer, kurzem Aufschütteln und Zentrifugieren, der Überstand abgesaugt, das Transfektionsreagenz hinzugegeben und erneut geschüttelt sowie zentrifugiert. Nach einer Inkubationsdauer von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Transfektionslösung den kultivierten HEK293 Zellen hinzugegeben. Die Zellen wurden nach 48 h in einem Lysepuffer abgelöst, resuspendiert (Zusammensetzung s. 3.5) und die Expression des BP180(VL) mittels Immunblotanalyse überprüft.

4.3 Arbeiten mit Proteinen

4.3.1 Rekombinante Proteine

4.3.1.1 BP180 Volllängenprotein

Die Aufreinigung des rekombinanten BP180 Volllängenprotein (BP180(VL)) erfolgte anhand eines Agarosegels mit kovalenter Bindung eines monoklonalen Anti-FLAG Antikörpers, welcher mit dem sogenannten FLAG-Tag des Proteins, dem Octapeptid (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys-C) reagiert.

Für die Aufreinigung des BP180 Proteins wurde eine mit TBS gespülte Gelsäule genutzt. Das Gelbett mit einem Volumen von 500 ml wurde zur Sicherstellung einer gleichmäßigen Beladung unter leichtem Schwenken gefüllt und anschließend fünfmal mit TBS gespült.

Während der Inkubation erfolgte die Bindung der M2 Antikörper des Gels an die Proteine. Anschließend wurde die Säule mit TBS gespült (10 bis 20-faches Bettvolumen entsprechend 5-10 mL), um nicht spezifisch an den M2 Antikörper bindende Proteine zu entfernen. Die anschließende Elution der gebundenen Proteine mithilfe eines sauren Glycinpuffer blieb jedoch aufgrund der starken Bindung des FLAG-markierten Proteins an den M2 Antikörper der Gelperlen erfolglos. Die Trennung des Proteins von den Gelperlen erfolgte mittels Lämmli-puffer unter Hitzedenaturierung bei 95 °C mit anschließender Zentrifugation. Das gewonnene BP180(VL) Protein wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.3.1.2 BP180 Ektodomänenfragmente 1-4

Als weitere rekombinante Proteinsubstrate wurden vier Fragmente der extrazellulären Domäne von BP180 (BP180(EK) F1-4) mit C-terminalem Histidin-Tag (Abb. 8.) von der Firma Euroimmun in HEK293 Zellen produziert und als ZÜ-Nr. 2631 (F1), 2632 (F2) und 2633 (F3) bereitgestellt; ebenso ZÜ-Nr. 2638 (F4) mit N-terminalem Histidin-Tag.

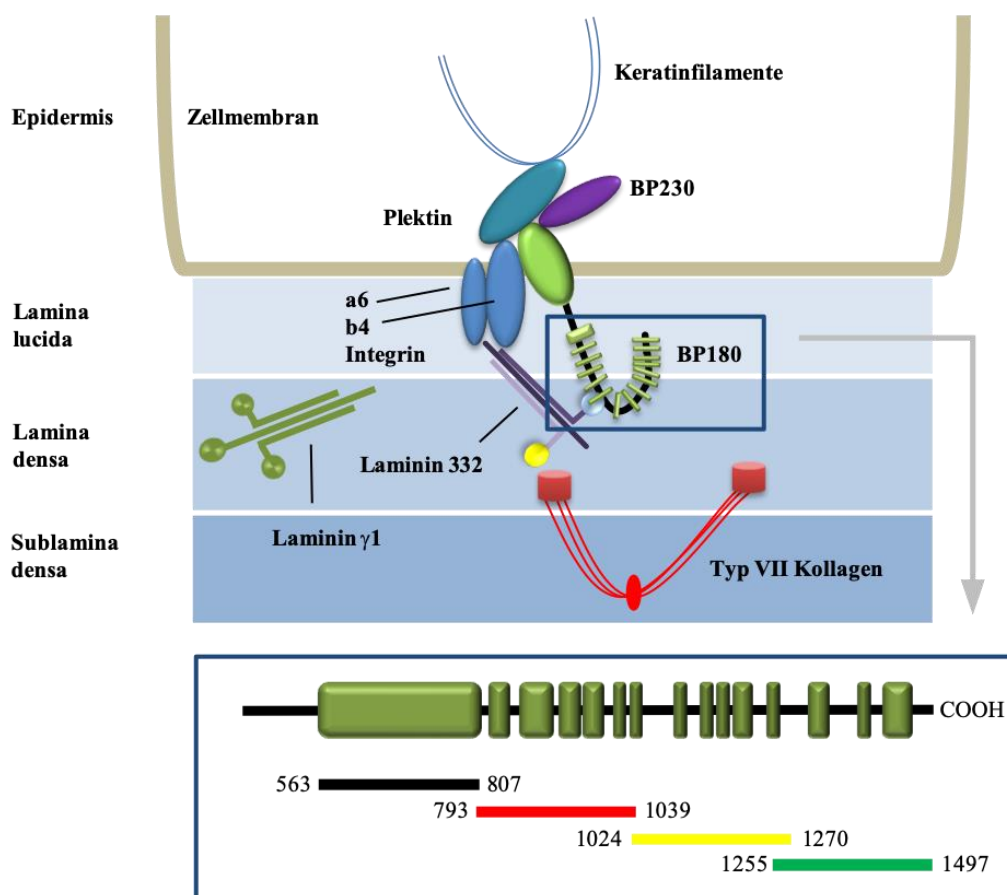


Abb. 8: Modifizierte schematische Darstellung der dermoepidermalen Junctionszone. Die BP180(EK) ist vergrößert dargestellt und durch die BP180(EK) Fragmente 1-4 (schwarz, rot, gelb, grün) unterteilt. Bei jedem der 4 dargestellten Fragmente ist die Aminosäurezahl angegeben (in Anlehnung an Holtsche et al., 2018 (118)).

Da sich F1 von Aminosäure 563-807, F2 von 793-1039, F3 von 1024-1270 und F4 von 1255-1497 erstreckt, überschneiden sich die vier vorliegenden Fragmente an ihren Schnittstellen. Die Lagerung des Biomaterials bis zu seiner Verwendung erfolgte in Aliquoten der BP180-Fragmente zu jeweils 1x 10 mL und 10x 1 mL in Tris-HCL Puffer pH 7,4 mit Sucrose (% w/ v), 5 mM EDTA und 1 mM PMSF bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Da das im Puffer enthaltene EDTA die Aufreinigung durch Komplexbildung mit Kobaltionen der TALON Matrix behindert hätte, erfolgte eine Umpufferung der Fragmente mit Hilfe des Guanidin-haltigen TALON Waschpuffers. Hierfür wurde jeweils 1 mL der Fragmentlösung in 50 mL Gefäße umgefüllt. Diese wurden für die Proteinfragmente 1 und 2 mit 10 mL Waschpuffer unter nachfolgendem Zusatz von 100 μL Protease Inhibitor aufgefüllt. Die Lösungen der Fragmente 3 und 4 wurden ebenfalls mit Guanidin auf 10 mL aufgefüllt, jedoch nur mit 50 μL Protease Inhibitor versetzt, entsprechend der Gesamtmenge des eingesetzten Proteins, welche für diese beiden Fragmente in geringerer Konzentration vorlag. Anschließend folgte die Ultraschallbehandlung der Proteinextrakte (3x in 7er Zyklen für jeweils 20 Sekunden) mit nachfolgender Umfüllung in *Amicon® Ultra Zentrifugal Filter* (10 K) und Aufkonzentrierung mit einmaliger Wiederholung.

Die Aufreinigung der rekombinanten BP180(EK) Fragmente erfolgte affinitätschromatografisch unter Verwendung einer TALON Matrix. Hierbei führen vier Kobaltionen der Harzmoleküle zur Bindung der His-Tag Proteine und ermöglichen somit deren Aufreinigung unter Auswaschung der übrigen Proteine. Die hier genutzte TALON Matrix (*TALON Metal Affinity Resin*) wurde für die Chromatographiesäulen nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Nach Spülung der bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten TALON Matrix mit je 20 mL des Guanidin-haltigen TALON Waschpuffers, welcher zuvor zum Umpuffern verwendet worden war, wurden die Lösungen der Fragmente 1-4 in jeweils 2 mL TALON Waschpuffer (Zusammensetzung s. 3.5) auf die TALON Matrix gegeben und auf einem Rotator für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Matrix-Fragmentansätze auf Polypropylensäulen gegeben und die jeweiligen Eluate bis zu einer OD_{450} von 0.01 aufgefangen bzw. gewaschen und 10 Minuten mit TALON Elutionspuffer inkubiert. Von diesem wurden jeweils 3 mL auf eine Säule gegeben und die Fragmente bis zu einer OD_{450} von 0,01 eluiert. Anschließend wurden die jeweiligen Eluate mittels Ultrafiltration (4000 rpm/ 20 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) in *Amicon® Ultra 15 mL Zentrifugal Filtern* (10 k MWKO) aufkonzentriert, in 6 M Urea Puffer umgepuffert und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Während dieses Vorgangs wurden jeweils Proben der vier Teilschritte (des initialen Fragment-Waschpufferansatz, des Durchflusses, des

Waschgangs und der Elution) entnommen, um den Erfolg der Aufreinigung überprüfen zu können. Um die Ausbeute des Zielproteins zu erhöhen, wurde der gesamte Vorgang mit dem Durchfluss der ersten Aufreinigung wiederholt.

Die TALON Matrix wurde zur Regeneration zweimal mit 10 mL TALON Regenerationspuffer gewaschen. Es folgten drei Schritte mit je 10 ml MES Puffer, drei Waschschrte mit je 10 mL destilliertem Wasser, sowie ein Waschschrte mit 10 mL 20 % Ethanol. Anschließend wurde die Säulenmatrix mit 20 % Ethanol beschichtet und bei 4 °C gelagert.

4.3.1.3 BP180 Ektodomäne (BP180(EK))

Die in dieser Arbeit eingesetzte, durch Expression mittels HEK293 Zellen produzierte, extrazelluläre Domäne von BP180 (AS 489-1497) wurde von der Firma *Euroimmun AG* zur Verfügung gestellt. Die Lagerung der Proteinlösung erfolgte in Aliquoten bei -20 °C. Aufgrund eines C-terminalen His-Tags wird das Protein sowohl von Anti-His-Tag Antikörpern als auch von Anti-NC16A Antikörpern detektiert. Ein bereits vor Beginn dieses Projektes etablierter Immunblot zur Detektion von BP180-spezifischen Autoantikörpern mit Hilfe des BP180(EK) Extraktes stand für diese Untersuchung zur Verfügung.

4.3.2 Konzentrationsbestimmung BP180(EK) Fragmente

Zur Messung der Gesamtproteinkonzentration gegen einen Proteinstandard wurde der *Pierce BCA (Bicinchoninsäure) Reagenz Assay* aus der Laborroutine übernommen. Hierzu wurden die BSA Proteinstandards nach Protokoll des Herstellers auf neun 1,5 mL Gefäße (A-I) verteilt, die in 6 M Urea Puffer vorliegenden BP180(EK) F1-4 auf 3 M Urea verdünnt und davon jeweils 30 µL zusammen mit 30 µL PBS in ein 1,5 mL Gefäß pipettiert. Nach Übertragung von jeweils zweimal 25 µL dieser Proben in Mikrotiterplatten erfolgte die Zugabe von 200 µL des nach Herstellerangaben vorbereiteten BCA Reagenz und die Pipettierung von jeweils zweimal 25 µL der Proteinstandards. Die so beladene Mikrotiterplatte wurde anschließend mit einer transparenten Klebefolie abgedeckt, und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Substratmessung erfolgte mittels Adsorptionsmessung (*Glomax Discover*) bei einer OD von 562 nm innerhalb von 10 Minuten. Die Berechnung der Messwerte wurde anhand der BSA Standardkurve mittels *Excel* durchgeführt. Die Reinheit der Proteinsubstrate wurde abschließend anhand einer SDS Gelelektrophorese der aufgereinigten Proteine und einer BSA Standardreihe geprüft (s. 5.4) und zur Dokumentation digitalisiert.

4.4 SDS-PAGE

4.4.1 Prinzip

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur größenbezogenen Auftrennung von Proteingemischen. Als stark anionisches Detergens ermöglicht SDS in überschüssiger Lösung das Überdecken der Eigenladungen der Proteine und die gleichmäßige Anlagerung der einfach negativ geladenen SDS Moleküle an die denaturierten Proteine. Die Funktion des Polyacrylamidgels gleicht somit der eines Siebs, welches große Proteine zurückhält, während kleine Proteine im elektrischen Feld durch das Gel wandern und anhand mitlaufender Proteinmarker bekannter molekularer Masse in ihrer Größe abgeschätzt werden können.

Das in dieser Arbeit angewandte Verfahren wird als diskontinuierlich bezeichnet, da hierbei zunächst die Konzentration der Proteine im Sammelgel erfolgt und daraufhin das Durchwandern des Trenngels zur Separation führt.

4.4.2 Protokoll

4.4.2.1 Vorbereitung des Gelkammersystems

Die Vorbereitung des Gelkammersystems erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Im Voraus wurden die Platten gewaschen, getrocknet und mit Alkohol poliert.

4.4.2.2 Herstellung der Gele

Die eingesetzten Gele wurden jeweils den Erfordernissen der Auftrennungen verschiedener Extrakte und Proteine angepasst (s. Zusammensetzung 3.6).

4.4.2.3 Durchführung der SDS-PAGE

Die Durchführung der Gelelektrophorese machte zunächst eine Mengenoptimierung der Proteinextrakte für die Beladung der Geltaschen erforderlich. Hierzu wurde jedes der Substrate und ein Marker in einer vierstufigen Verdünnungsreihe mit Hilfe eines 5-Taschen-Kamms in die Taschen des Gels gefüllt. Bei erfolgreicher Darstellung der gesuchten Bande im nachfolgenden Immunblot folgte die Herstellung eines sogenannten Präparationsgel für das jeweilige Proteinsubstrat als Protein-geladenes einfaches Taschengels. Bei der Membranherstellung war demnach folgende Überlegung als essentiell: Eine Geltasche im 5er Kamm weist eine Länge von 1,2 cm auf, während die große Tasche im Präparationsgel 6,8 cm lang ist. Dieses Längenverhältnis von 5,67 ist der Faktor beim Berechnen der aufzutragenden

Proteinmenge. Die Menge an Protein, die das beste Ergebnis zeigte, wurde fortan für die Herstellung der Membran eingesetzt.

Die Extrakte (BP180(EK) F1-4, BP180(VL), BP180(EK), LAD-1) wurden in Urea 6 M und 5x SDS Probenpuffer (PP) (1:5 der Gesamtmenge) übertragen und bei 95 °C über 5 Minuten denaturiert, bevor die Beladung des Gels erfolgte. Das Extrakt der EZM lag vor der Beladung des Gels ausschließlich mit 5x SDS PP vor und wurde ebenfalls 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Als Marker wurden stets 10 µL des Multicolor Markers verwendet. Nach initial 20-minütigem Lauf der Proben durch das Sammelgel bei 170 V, 25 mA und 100 W liefen diese bei anschließend gleicher Spannung und Leistung mit einer Stromstärke von 50 mA durch das Trenngel, sodass sich die Gesamtlaufzeit der Elektrophorese für LAD-1 auf 150 Minuten und für die restlichen Proteinextrakte auf 80 bis 120 Minuten belief. Nach dreimaligem Waschen der Gele mit Aqua dest. erfolgte über Nacht die Färbung der Proteinbanden mittels Coomassie Brilliant Blue G-250, der abschließende Austausch der Farblösung gegen ddH₂O zur Entfärbung des Gels und die Dokumentation bzw. Archivierung in digitalisierter Form.

4.5 Immunblot

4.5.1 Prinzip

Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE ermöglicht das Immunblot (Westernblot) Verfahren den spezifischen Nachweis bzw. die Identifikation der Proteine. Sämtliche durch SDS Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennten Proteinbanden werden hierzu auf eine Trägermembran aus Nitrozellulose übertragen. Dieser Vorgang ermöglicht ein zur Gelauftrennung senkrecht stehendes elektrisches Feld, welches die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Membran haften und nachfolgend anhand spezifischer Antikörper identifizieren lässt. Freie Bindungsstellen werden zuvor auf der Membran geblockt, um die unspezifische Bindung des Antikörpers an diesen Stellen zu verhindern. Die Detektion der Proteine erfolgte in diesem Projekt mit Hilfe von Sekundärantikörpern, an welche entweder eine Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish-peroxidase*) oder eine Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist.

4.5.2 Protokoll

4.5.2.1 Transfer

Die Blotapparatur (Abb. 9) hilft beim Übertragen der Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran durch das Anlegen einer Spannung von 120 V über eine Stunde.



Abb. 9: Schematische Darstellung des Aufbaus der Blotapparatur.

4.5.2.2 Färben

Die anschließende Erfolgsüberprüfung des Transfers erfolgte durch Färbung der Substrate mittels der Farblösung (*Fast Green*) und nachfolgendes, dreimaliges Waschen in Aqua dest. zur Entfärbung der Membran.

4.5.2.3 Membranbearbeitung

Zur Austitration der Positivkontrollen sowie für die Patientenseren und Negativkontrollen wurden aus jeder auf der Membran abgebildeten Tasche entsprechend viele Streifen geschnitten. Nach der Aufreinigung der Proteinextrakte wurden außerdem Inkubationen ganzer Membranen zum Nachweis des His-Tag und zur Überprüfung der Proteingrößen durchgeführt.

4.5.2.4 Immunblot

Die Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen wurde vorab durch eine einstündige Inkubation der Membran in Blockierungspuffer auf einem Schüttler bei einer Geschwindigkeit von 20 bis 30 rpm bei Raumtemperatur ermöglicht. Zur Detektion der Proteine folgte die Inkubation der Membran mit einem primären und sekundären Antikörper (s. 4.4). Hierfür wurden Patientenseren sowie humane Kontrollseren in verschiedenen Verdünnungen verwendet. Da sowohl LAD-1 als auch EZM Membranauswertungen Mindesttiter an Autoantikörpern voraussetzen, wurden ausschließlich bereits in Routineblots verwendete Positivkontrollen (BP Serum) mit Titern von 1:1600 für LAD-1 und 1:800 für EZM (s. 4.4) eingesetzt. Andernfalls ergab die gewählte Menge des verwendeten Extraktes kein verwertbares Ergebnis. So musste die Probe mit dem geringsten noch detektierten Titer als Kontrolle in den nachfolgenden Immunblots mitlaufen. Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte jeweils über Nacht auf einem Schüttler mit einer Geschwindigkeit von 20 bis 30 rpm bei 4 °C. Nach jeweils drei Waschstufen mit 1x TBST über 10 Minuten erfolgten Inkubation der Membran mit den jeweiligen Sekundärantikörpern über 1 Stunde und dreifaches Waschen über 10

Minuten mit 1x TBST. Eine Optimierung der Immunblots ließ sich soweit notwendig, durch jeweilige Veränderungen der Elektrophorese-Gele, Laufzeiten, Pufferzusammensetzungen, Serumverdünnungen oder Verarbeitungstemperaturen erreichen (s. 4.4).

4.5.2.5 Visualisierung

Die Entwicklung der Membran schloss den jeweiligen Immunblot ab. Für LAD-1, BP180(VL) und die BP180(EK) F1-4 wurden hierzu die ausgeschnittenen und in Pufferlösung (10 mL Aqua dest. und eine DAB Puffertablette) gegebenen Membranstreifen unter Zugabe von 20 µL H₂O₂ (30 %) direkt vor der Färbung so lange gefärbt, bis die Positivkontrolle bei negativen gesunden Blutspendern eine deutliche Reaktion zeigte. Das Stoppen des Entwicklungsvorgangs erfolgte durch Aqua dest. Für die Entwicklung der BP180(EK) wurde das NBT/ BCIP Reagenz verwendet. Die Visualisierung der Banden der extrazellulären Matrix erfolgte mit Hilfe des *ECLTM Prime* Reagenz in der Dunkelkammer. Zur Testauswertung wurden die Molekulargewichtsmarker sowie die positive und die negative Kontrolle eingezeichnet (s. Ergebnisse).

5. ERGEBNISSE

5.1 LAD-1 Immunblot

Die serologische Diagnostik des BP und SHP setzt den Nachweis zirkulierender Serumautoantikörper gegen diverse Domänen des BP180 Proteins voraus. Als Standard für die Untersuchung solcher Seren betroffener Patienten ohne Autoantikörper gegen NC16A wird der LAD-1 Immunblot im Lübecker Autoimmunlabor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, wie auch für Patientenserum mit linearer IgA-Dermatose, eingesetzt (s. Abb. 10 und 2.4). Dieser gilt daher als Referenz und dessen Reaktivität als Voraussetzung für die im Projekt optimierten Immunblots der Proteine BP180 Volllänge (BP180(VL)), BP180 Ektodomäne (BP180(EK)), BP180 Ektodomänenfragmente 1-4 (BP180(EK) F1-4) und des Extraktes der extrazellulären Matrix (EZM).

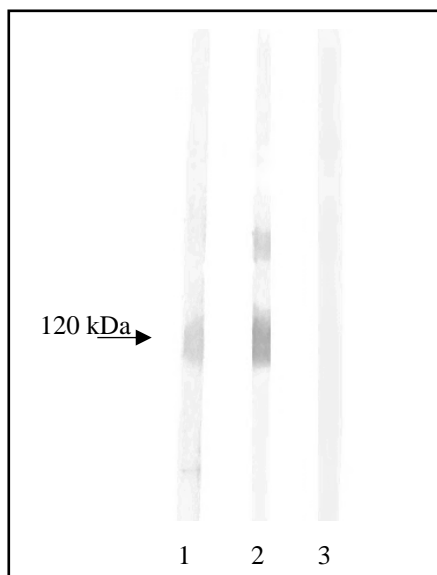


Abb. 10: Bisher verwendeter LAD-1 Immunblot

Streifen 1 zeigt ein SHP Serum mit einer Bande bei 120 kDa (1). Streifen 2 weist ein LAD-1-positives BP Serum auf (2). Streifen 3 zeigt nach Inkubation mit einem gesunden Blutspender (GBS) als Primärantikörper keine Reaktivität. Links der Abbildung ist das Molekulargewicht in kDa angegeben und durch einen Pfeil markiert.

Eine Gesamtzahl von 68 BP und 74 SHP NC16A-negativen Patientenserum wurde anhand des LAD-1 Immunblots detektiert und somit initial für die folgende Untersuchung ausgewählt.

Zur Optimierung der Diskriminierung von Proteinbanden im SDS-PAGE Verfahren wurde im Anschluss der Routinemethode eine jetzt auf 120 bis 140 Minuten prolongierte Gelelektrophorese durchgeführt. Diese Modifikation ließ an der zuvor auftretenden 120 kDa Bande die Abtrennung einer weiteren ähnlich ausgeprägten Bande erkennen (s. Abb. 11). Dieses Phänomen der Diskriminierung einer zusätzlichen Bande galt es daher ebenfalls auf seine Bedeutung bezüglich der Sensitivität und Spezifität zu untersuchen.

Im modifizierten Immunblot wiesen 51 der zuvor detektierten 68 BP und 30 der 74 SHP Seren eine Doppelbande bei 120 kDa auf. Die Sensitivität lag somit bei 75 % für BP und 41 % für SHP Seren. Die Anzahl der in die Studie eingeschlossenen Patientenserum reduzierte sich daher für die nachfolgenden Untersuchungen spezifischer Zielepitope auf 51 BP und 30 SHP Seren. Als Negativkontrollen mit einer Spezifität von 100 % dienten 54 GBS Seren (Abb. 12).

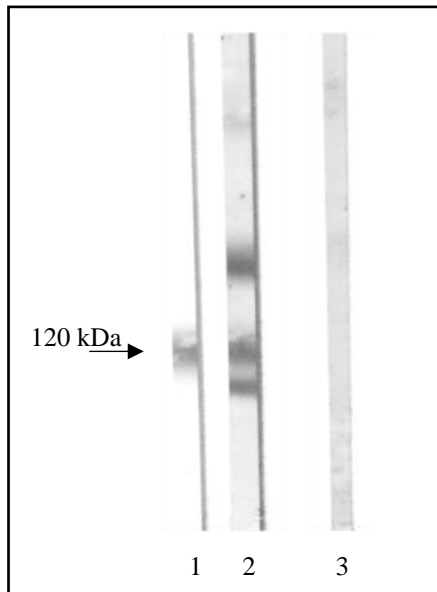


Abb. 11: Modifizierter LAD-1 Immunblot

Streifen 1 wurde mit dem monoklonalen Kaninchen Anti-Human Kollagen XVII Antikörper *EPR18614* als Primärantikörper inkubiert und detektiert eine Bande bei 120 kDa. Streifen 2 zeigt ein BP Serum ebenfalls mit LAD-1 Reaktivität. Zudem ist die zusätzliche Bande der modifizierten Methode zu erkennen (s. 5.1). Streifen 3 weist nach Inkubation eines GBS als Negativkontrolle keine Reaktivität mit LAD-1 auf. Links der Abbildung ist das Molekulargewicht in kDa angegeben und durch einen Pfeil markiert.

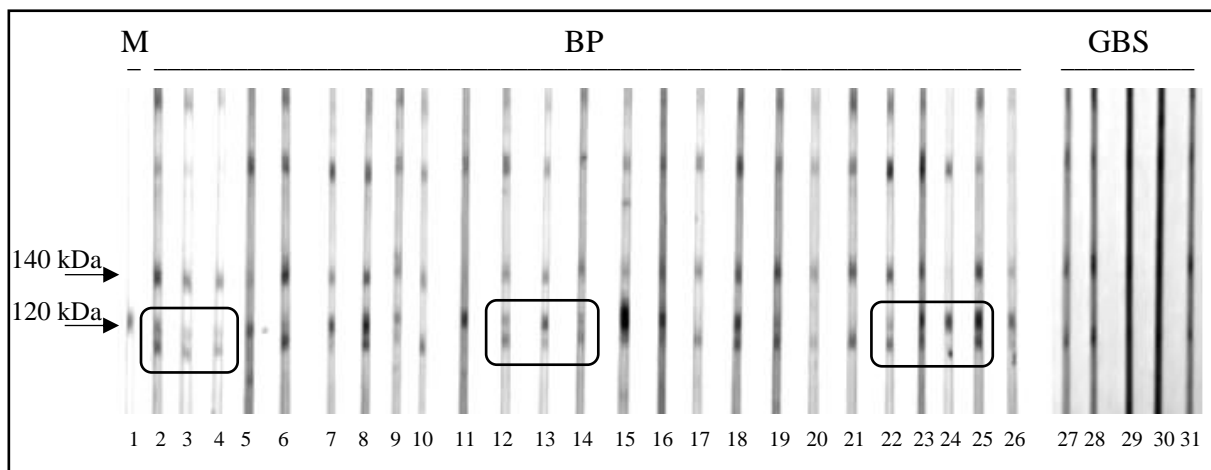


Abb. 12: Modifizierter Immunblot des LAD-1 Extraktes mit BP Seren

Der dargestellte Immunblot bietet ein repräsentatives Beispiel für den modifizierten LAD-1 Immunblot von Patientenseren mit einer Autoantikörperreaktivität gegen die 120 kDa LAD-1 Bande wie auch eine zusätzliche Bande bei 120 kDa (exemplarisch gezeigt durch Rechtecke). Auf Streifen 1 lässt sich durch monoklonale Kaninchen Anti-Human Kollagen XVII Antikörper *EPR18614* in Verdünnung (1:32000) nach Inkubation mit Ziegen Anti-Kaninchen IgG/ HRP Antikörper (1:1000) eine Bande bei 120 kDa markieren. Die Streifen 2-26 zeigen BP Seren in Verdünnung von 1:100, welche nach Inkubation mit Anti-Human IgG/ HRP Antikörper (1:500) überwiegend eine zusätzliche Bande bei 120 kDa aufweisen. Die Streifen 27-31 zeigen richtig-negative GBS (1:100). Die Visualisierung erfolgte mittels DAB. Links der Abbildung ist das Molekulargewicht in kDa angegeben und durch Pfeile markiert.

5.2 Extrazelluläre Matrix

Eine potentielle Möglichkeit der diagnostischen Optimierung bestand in der Testung der verwendeten BP und SHP Seren mit dem Anti-Human IgG4 Antikörper. In diesem Schritt wurde geprüft, ob sich die Verwendung dieses Sekundärantikörpers anstelle des Anti-Human IgG/ HRP Antikörpers zur Reduktion unspezifischer Reaktionen des Experiments eignet. Mit Hilfe des durch HaCaT Zellen hergestellten Extraktes der extrazellulären Matrix (EZM) wurde IgG4 als prädominante Subklasse der verwendeten Blutseren nachgewiesen und 49 der 51 untersuchten BP Seren im EZM Immunblot getestet. 2 der 51 BP Seren waren nicht mehr verfügbar. Darüber hinaus wurden 30 SHP Seren und 54 gesunde Blutspender auf IgG4 Antikörper gegen BP180 getestet (Abb. 13).

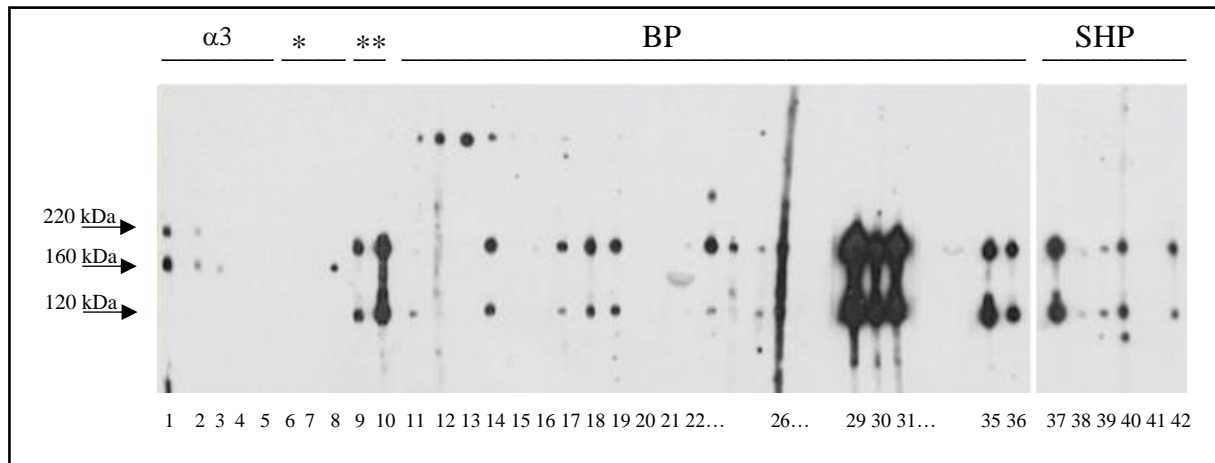


Abb. 13: Immunblot mit EZM Extrakt

Die Detektion von Antikörpern gegen EZM im Immunblot erfolgte durch ein ECL Reagenz, die anschließende Visualisierung mittels Röntgenfilm in der Dunkelkammer. Streifen 1-5 zeigen Laminin 332, $\alpha 3$ -Kette als Standardreihe, Streifen 6-8 gesunde Blutspender (*), 9 und 10 Positivkontrollen (**). Streifen 11-36 zeigen BP und Streifen 37-42 SHP Seren.

Bei 30 von 49 (61,2 %) BP Seren wurde der Nachweis von IgG-Subklasse 4 erbracht. 20 der 30 (66,7 %) SHP Patientenseren waren ebenfalls IgG4-positiv. Keine der 54 getesteten GBS Proben war im Immunblot EZM-positiv. Das entspricht einer Spezifität von 100 % für Pemphigoid Patienten (Tab. 15).

Durch den Verlust von zuvor untersuchten BP wie auch SHP Seren war der Test des Anti-Human IgG4 Antikörpers als Sekundärantikörper in seiner Reaktivität gegen diese Patientenseren bedauerlicherweise nicht mehr möglich.

Tabelle 15: Reaktivität der BP und SHP Seren mit EZM			
	EZM+	EZM-	Gesamt
BP Seren	30	19	30/ 49 (61,2 %)
SHP Seren	20	10	20/ 30 (66,7 %)
77 GBS	-	54	0/ 54 (0 %)

5.3 Reaktivität der BP und SHP Seren mit BP180(VL) und BP180(EK)

Nach dem Testen der Patientenseren im LAD-1 Immunblot wurde deren Reaktivität in dem optimierten BP180(VL) Immunblot überprüft. Da BP180(VL) nach erfolgreicher Expression (s. 4.1 bzw. 4.2.4) und Aufreinigung (s. 4.3.1.1) denaturiert in Lämmli-puffer vorlag, war eine kolorimetrische Bestimmung der Konzentration nicht möglich. Die erforderliche Proteinmenge für das Präparationsgel des optimierten Immunblots war somit erst durch diverse Modifikationen des Immunblots zu ermitteln und betrug schließlich 5,5 µL der zu untersuchenden Seren (1:100) (s. Abb. 14).

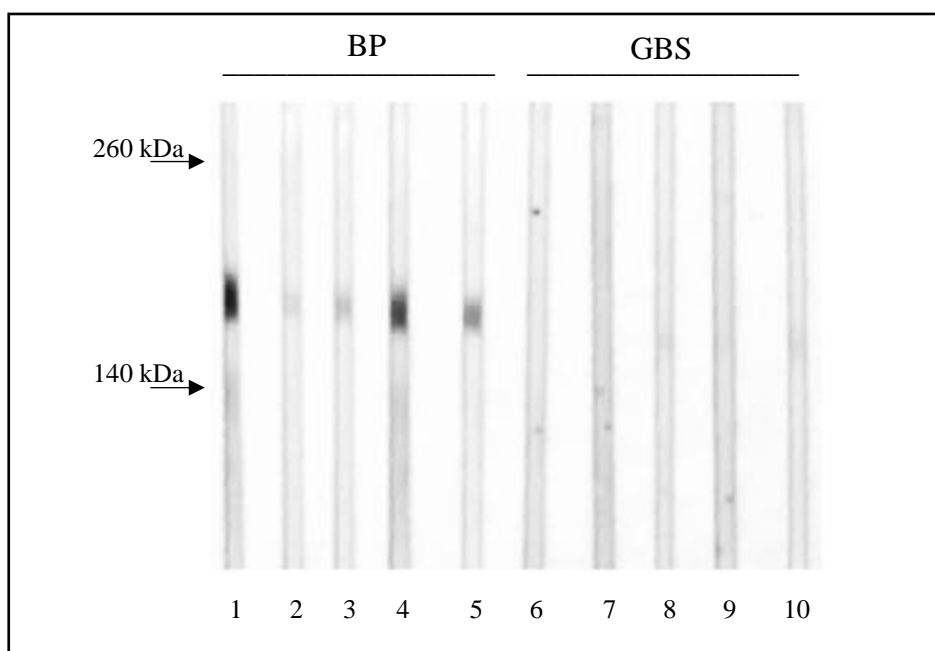


Abb. 14: Repräsentativer BP180(VL) Immunblot mit BP Seren

Streifen 1-5 zeigen Reaktivität der BP Seren (1:100) mit der Proteinbande bei 180 kDa in unterschiedlicher Intensität. Dagegen reagieren die GBS nicht mit dem Protein (6-10). Links der Abbildung ist das Molekulargewicht in kDa angegeben und durch Pfeile markiert.

Für BP bzw. SHP zeigte der BP180(VL) Immunblot eine Sensitivität von 100 % (51/ 51) bzw. 73 % (22/ 30) bei 51 bzw. 30 getesteten Seren, die Spezifität betrug 94 % bei 54 gesunden Kontrollen (3/ 54).

Die BP und SHP Patientenseren wurden ebenfalls mit der BP180(EK) via Immunblot getestet (Abb. 15). Die Proteinkonzentration von BP180(EK) betrug 0,4 mg/ mL. Bei der Durchführung der SDS-PAGE führte eine Dosistitration zur optimalen Beladungsmenge mit 4 µL BP180(EK) bzw. einer Proteinmenge von 1,6 µg.

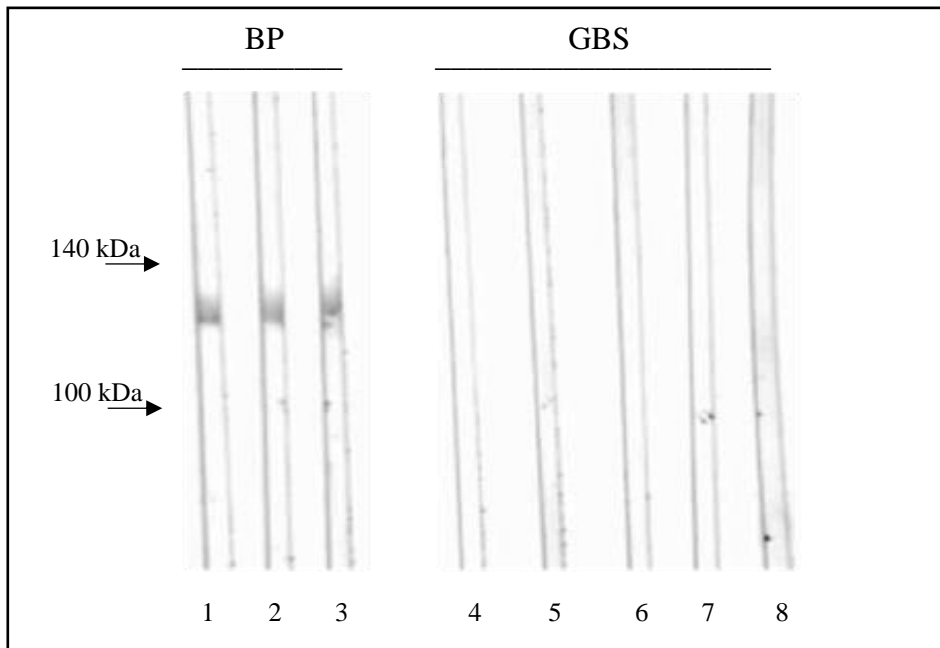


Abb. 15: Repräsentativer BP180(EK) Immunblot mit BP Seren

Streifen 1-3 zeigen BP Seren (1:100), die nach Inkubation mit Anti-Human IgG AP (1:5000) als Sekundärantikörper jeweils eine Bande bei ca. 130 kDa aufweisen. Streifen 4-8 wurden mit Seren gesunder Blutspender inkubiert und zeigen keine Reaktivität. Links der Abbildung ist das Molekulargewicht in kDa angegeben und durch Pfeile markiert.

Für BP bzw. SHP zeigte der BP180(EK) Immunblot eine Sensitivität von 98 % (50/ 51) bzw. 87 % (26/ 30) bei 51 bzw. 30 getesteten Seren, die Spezifität betrug 94 % bei 54 gesunden Kontrollen (3/ 54).

5.4 Reaktivität der BP und SHP Seren mit BP180(EK) Fragmenten 1-4

Nach Aufreinigung der BP180(EK) F1-4 wurden diese mittels Gelelektrophorese und anschließendem Immunblot überprüft. Hierbei enthielten die BP180(EK) F1, 2 und 4 C-terminal und das BP180(EK) F3 N-terminal jeweils ein Histidin-Tag für die Antikörperdetektion im Immunblot (Abb. 16, 17 und 18).

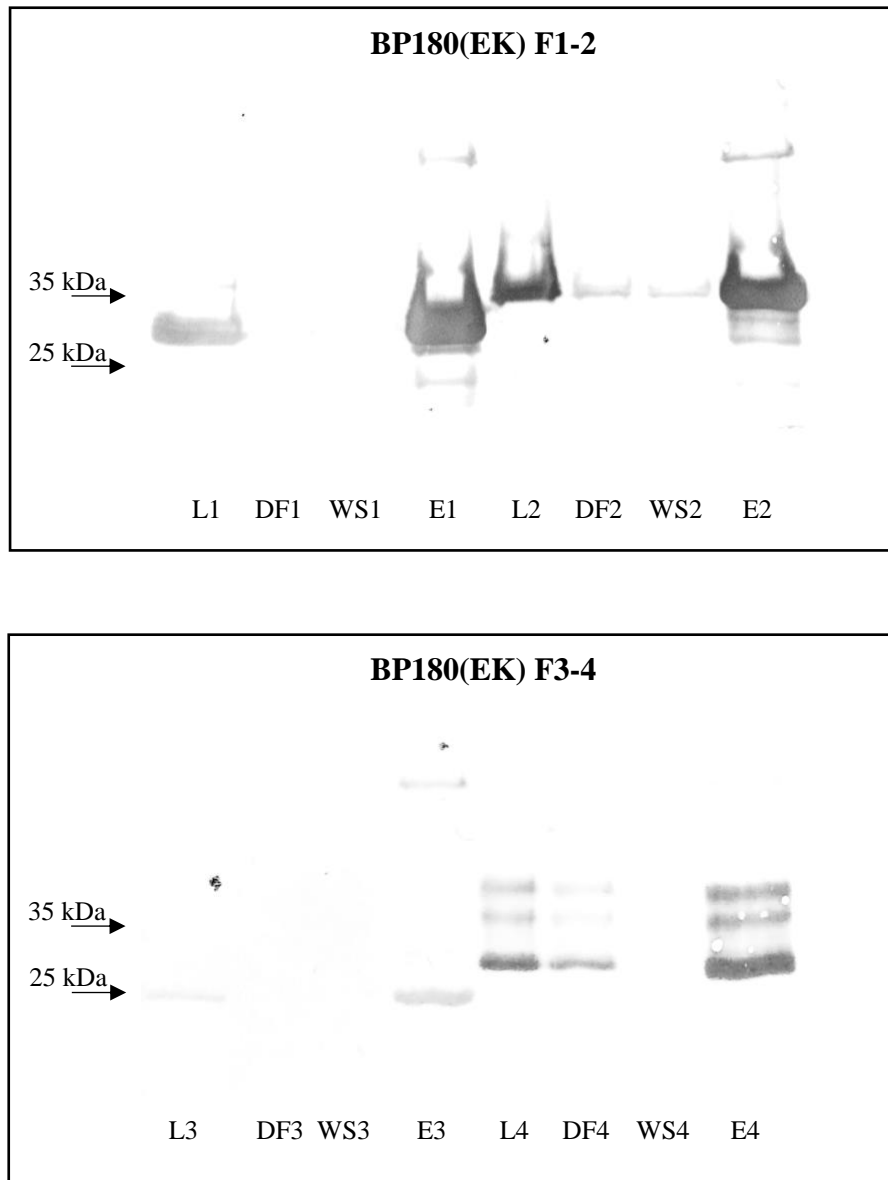


Abb. 16 und 17: Die Aufreinigungsschritte der BP180(EK) F1-4 im Immunblot

Immunblots der BP180(EK) F1-2 und 3-4. Die Polyhistidin-Tags der BP180(EK) Fragmente sind mit einem Anti-His-Tag Antikörper (1:1000) markiert. Als sekundärer Antikörper fungiert ein polyklonaler Kaninchen Anti-Maus IgG / HRP Antikörper (1:1000). Auf diese Weise wird unaufgereinigtes Lysat (L), Durchfluss (DF), Waschschrift (WS) und Eluat eines jeweiligen Fragments überprüft. F1 und 2 haben eine größere Masse (ca. 30-35 kDa) als F3 und 4 (ca. 25-30 kDa). Die Visualisierung der F1-4 erfolgt mittels DAB. Links der Abbildungen sind die Molekulargewichte in kDa angegeben und durch Pfeile markiert.

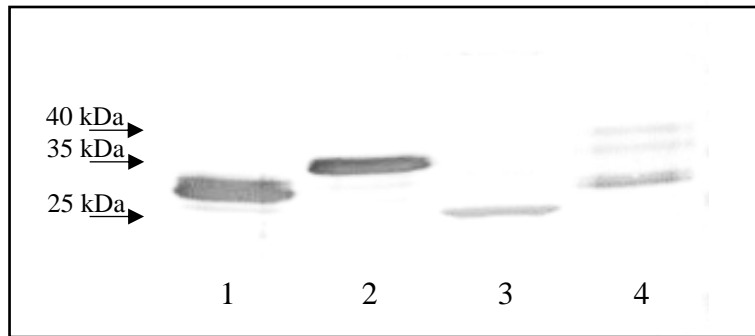


Abb. 18: Übersicht der aufgereinigten BP180(EK) F1-4 im Immunblot

Bande 1, 2 und 3 zeigen BP180(EK) F1-3 nach durchgeführter Aufreinigung. F4 (4) zeigt drei Banden zwischen 25 und 40 kDa, wobei die unterste, dunkel-sichtbare Bande zwischen 25 und 30 kDa der gesuchten Bande des Fragments entspricht. Links der Abbildungen sind die Molekulargewichte in kDa angegeben und durch Pfeile markiert.

Die kolorimetrische Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten BP180(EK) F1-4 ergab folgendes Ergebnis:

BP180(EK) F1: 199,80 µg/ mL

BP180(EK) F2: 272,52 µg/ mL

BP180(EK) F3: 163,44 µg/ mL

BP180(EK) F4: 108,90 µg/ mL

Zur Überprüfung der gemessenen Proteinkonzentration wurde eine Gelelektrophorese der aufgereinigten F1-4 gegen eine BSA Standardreihe durchgeführt (Abb. 19 und 20). Die Eluate der F1 und 2 wiesen in der Gelelektrophorese zahlreiche Proteinbanden, als Zeichen eines suboptimalen Aufreinigungsprozesses auf (Abb. 19). In Bezug auf ihre Molekulargewichte, von 25 bis 35 kDa wurden deren Banden mit den Banden der aufgetragenen BSA Standardmengen verglichen und zur Optimierung der Gelelektrophorese eine Anpassung der Proteinkonzentrationen vorgenommen.

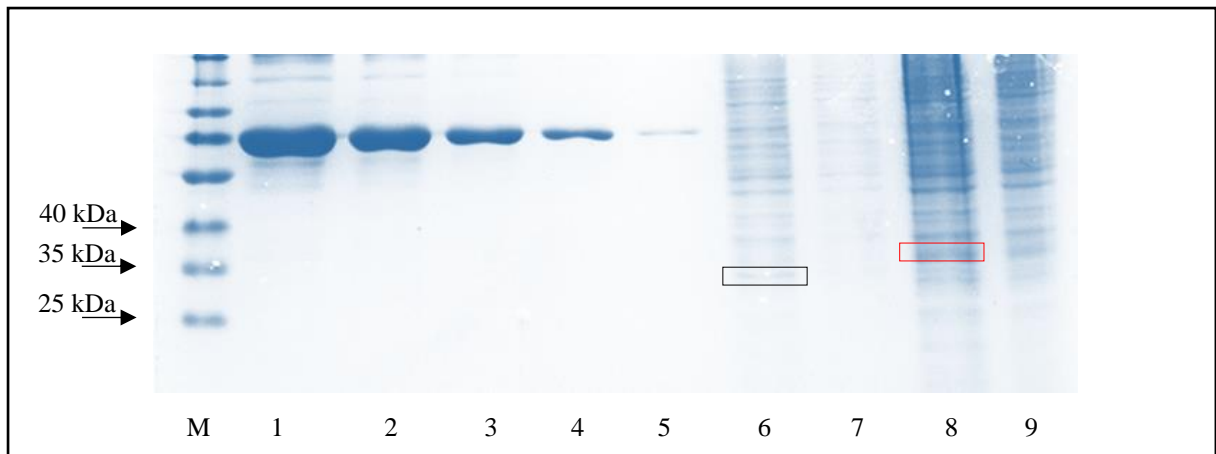


Abb. 19: Coomassie Färbung der SDS-PAGE der BP180(EK) F1-2 und einer BSA Standardreihe

Geltaschen 1-5 zeigen BSA Standards (1000 µg/ mL (1), 750 µg/ mL (2), 500 µg/ mL (3), 250 µg/ mL (4), 125 µg/ mL (5) in 6 M Urea. 6 und 7 zeigen F1 in Urea bzw. 1:2 mit Urea verdünnt. Streifen 8 und 9 zeigen F2 in Urea bzw. 1:2 mit Urea verdünnt. F1 (6) weist in geringer Intensität die gesuchte Bande zwischen 25 und 35 kDa auf (schwarzer Kasten). F2 (8) zeigt die gesuchte Bande bei ca. 35 kDa (roter Kasten). Links der Abbildungen sind die Molekulargewichte in kDa angegeben und auf Höhe der Molekulargewichte (M) durch Pfeile markiert.

Die kolorimetrisch geringere Expression von F4 liegt mit einer Konzentration von 108,90 µg/ mL deutlich unter denen der anderen Fragmente, so dass zur Überprüfung der Proteinkonzentration von F3 und F4 die BSA Standardreihe der Gelelektrophorese bis auf 62,5 µg/ µL verdünnt wurde (Abb. 20).

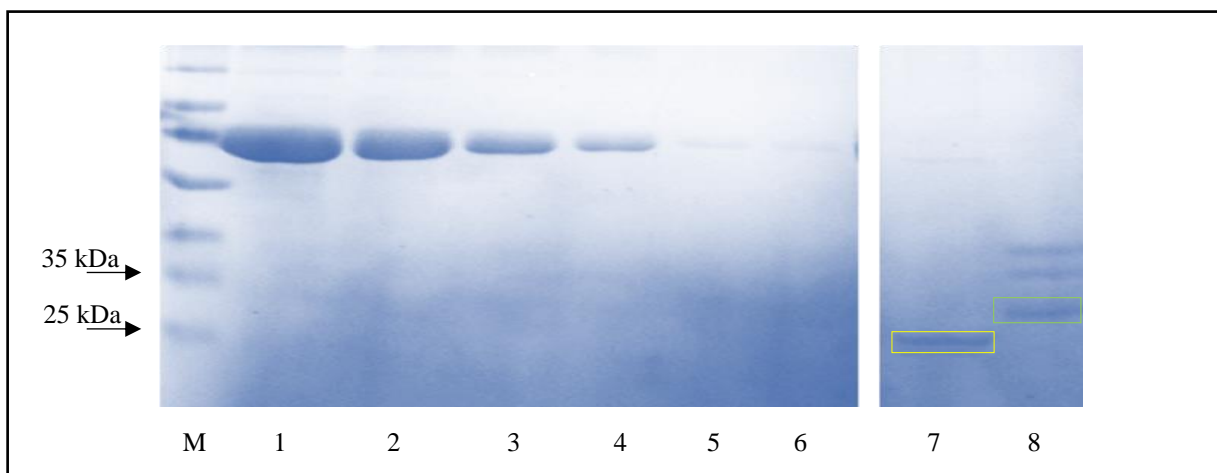


Abb. 20: Coomassie Färbung der SDS-PAGE der BP180(EK) F3-4 zusammen mit einer BSA Standardreihe

Geltaschen 1-6 zeigen die BSA Standardreihe (1000 µg/ mL (1), 750 µg/ mL (2), 500 µg/ mL (3), 250 µg/ mL (4), 125 µg/ mL (5), 62,5 µg/ mL (6) in Urea. Geltaschen 7 und 8 zeigen F3 (gelber Kasten) bei ca. 25 kDa und F4 zwischen 25 und 30 kDa (grüner Kasten) jeweils in Urea. Links der Abbildungen sind die Molekulargewichte in kDa angegeben und auf Höhe der Molekulargewichte (M) mit Pfeilen markiert.

Der Vergleich der Fragmente in Bezug auf ihre Banden führte in den Coomassie Gelen mit den aufgetragenen BSA Standards zu folgenden, in die Immunblots eingesetzten und der Tabelle 16 zu entnehmenden Proteinmengen.

Tabelle 16: Übersicht der Proteinmengen		
BP180(EK) F1	100 µg / mL	14,4 µg ± 144 µL
BP180(EK) F2	125 µg/ mL	14,4 µg ± 115 µL
BP180(EK) F3	175 µg/ mL	14,4 µg ± 82,5 µL
BP180(EK) F4	225 µg/ mL	14,4 µg ± 64 µL

Das Ziel bei der standardisierten Durchführung der Immunblots bestand darin, die Qualität der spezifischen Banden bezüglich Differenzierung und Anfärbbarkeit zu optimieren. Die entsprechende Proteinkonzentration wurde durch Titration der rekombinanten Proteine erreicht. Für jedes Proteinsubstrat wurde die optimale Blotkonfiguration bezüglich Puffer- und Gelzusammensetzung, Laufzeiten der Gelelektrophorese, Temperaturveränderungen und Serumverdünnungen ermittelt (s. Tab. 17 und 18).

Tabelle 17: Verwendete Primär-, Sekundärantikörper und Pufferlösungen								
	LAD-1	F1	F2	F3	F4	BP180 (VL)	BP180 (EK)	EZM
Blockpuffer	5 % (w/ v) MMP				8 % (w/ v) MMP	5 % (w/ v) MMP	<i>Euro-immun</i> Puffer	5 % (w/ v) MMP
Primär-AK (Verdünnung)	Pat. Serum (1:100)	Pat. Serum (1:50)	Pat. Serum (1:100)	Pat. Serum (1:800)	Pat. Serum (1:100)		Pat. Serum (1:50)	
Sekundär-AK	Anti-Human IgG/ HRP						Anti-Human IgG AP	Anti-Human IgG4 HRP
Verdünnung	1:500	1:1000		1:4000	1:1000	1:5000	1:10000	
Inkubationspuffer	1 % BSA	5 % (w/ v) MMP + 1 % BSA			8 % (w/ v) MMP + 1 % BSA	5 % (w/ v) MMP + 1 % BSA	<i>Euro-immun</i> Waschpuffer	5 % (w/ v) MMP + 1 % BSA

Tabelle 18: Immunblotkontrollen von LAD-1, BP180(EK) und EZM				
	LAD-1		BP180(EK)	EZM
Primär-AK (Verdünnung)	Monoklonaler Kaninchen Anti- Human Kollagen XVII (1:8000, 1:1600)	BP Positiv- kontrollen (1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400)	Anti-His-Tag IgG/ HRP (1:1000)	BP Positiv- kontrollen (1:200, 1:400, 1:800)
Sekundär-AK (Verdünnung)	Ziegen Anti- Kaninchen IgG/ HRP (1:1000)	Anti-Human IgG/ HRP (1:500)	Anti-Maus IgG/ HRP (1:1000)	Anti-Human IgG4/ HRP (1:10000)
Inkubations- puffer	1 % BSA		<i>Euroimmun</i> Waschpuffer	5 % (w/ v) MMP + 1 % BSA

Anschließend wurden die 51 BP und 30 SHP Seren mit den BP180(EK) F1-4 in den optimierten Immunblots getestet (s. Abb. 21-24).

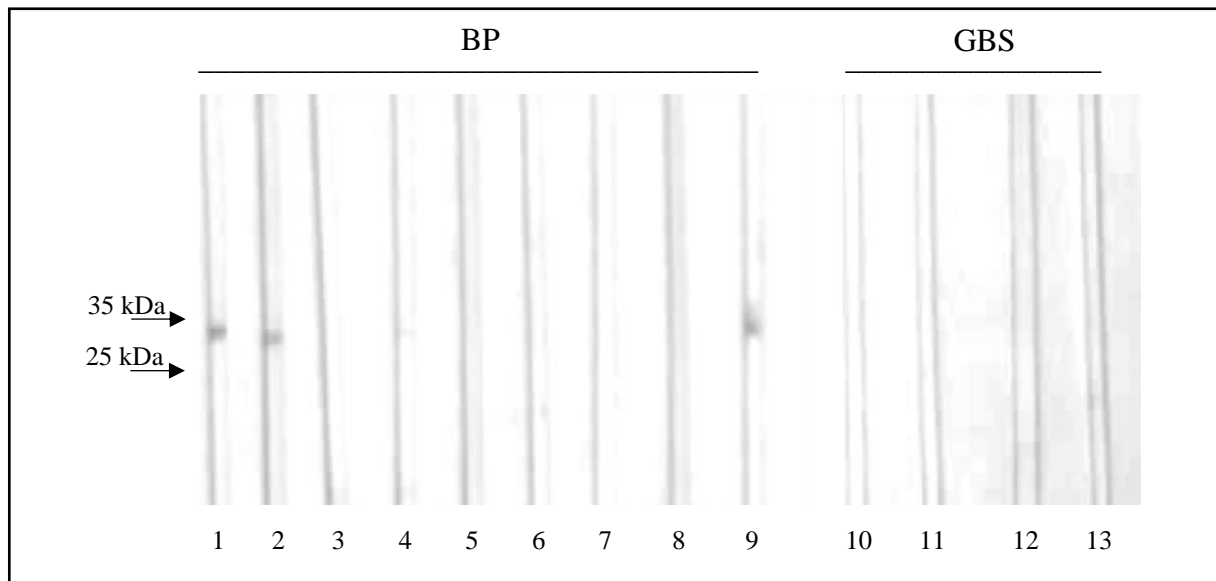


Abb. 21: Repräsentativer Immunblot des BP180(EK) F1

Streifen 1-9 zeigen BP Seren mit Banden zwischen 30 und 35 kDa. Streifen 10-13 zeigen Seren gesunder Blutspender (GBS). Als Sekundärantikörper wurde Anti-Human IgG/ HRP Antikörper (s. Tab. 16) verwendet. Die Visualisierung erfolgte mittels DAB. Links der Abbildung sind die Molekulargewichte in kDa angegeben und durch Pfeile markiert.

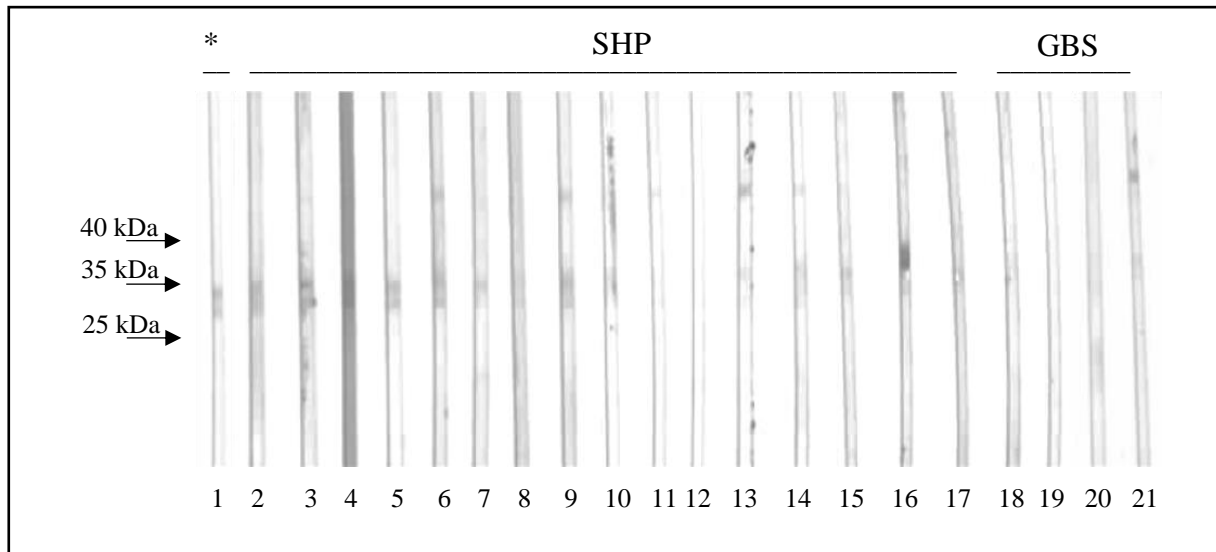


Abb. 22: Repräsentativer Immunblot des BP180(EK) F2

Streifen 1 zeigt eine Positivkontrolle (*, BP Serum) mit einer Bande zwischen 30 und 35 kDa. Streifen 2-17 zeigen SHP Seren, die überwiegend eine Reaktivität gegen F2 aufweisen. Dagegen weisen Streifen 18-21 als GBS keine Reaktivität mit F2 auf. Links der Abbildung sind die Molekulargewichte in kDa angegeben und durch Pfeile markiert.

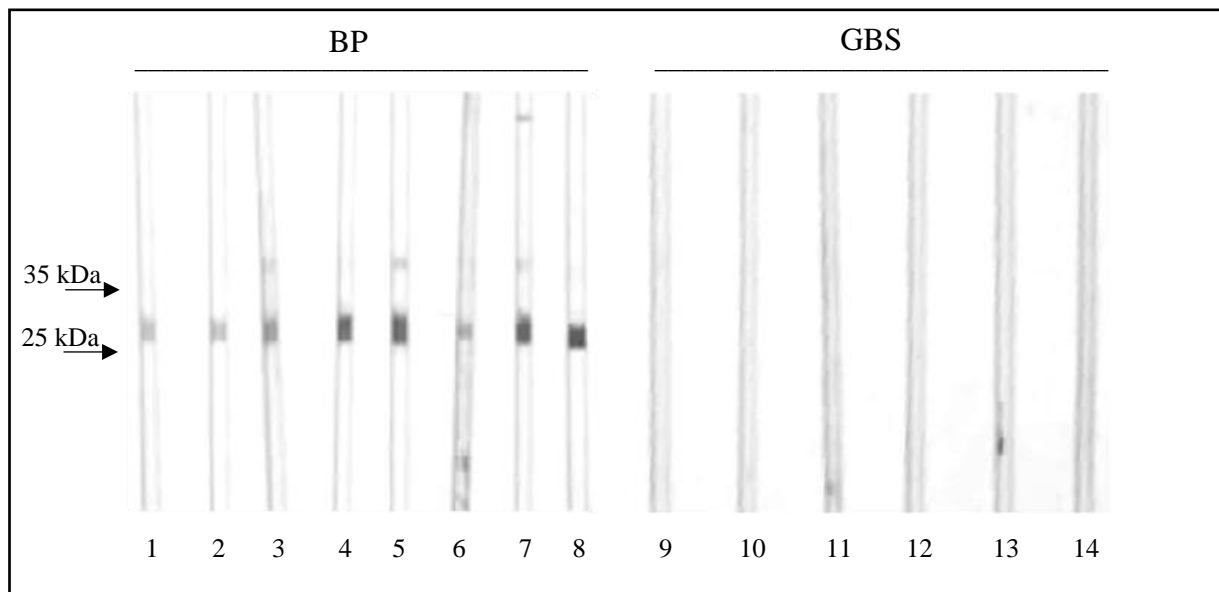


Abb. 23: Repräsentativer Immunblot des BP180(EK) F3

Streifen 1-8 zeigen als BP Seren eine Bande zwischen 25 und 30 kDa. Dagegen ist bei den Streifen 9-14 als GBS keine Reaktivität mit F3 sichtbar. Links der Abbildung sind die Molekulargewichte in kDa angegeben und durch Pfeile markiert.

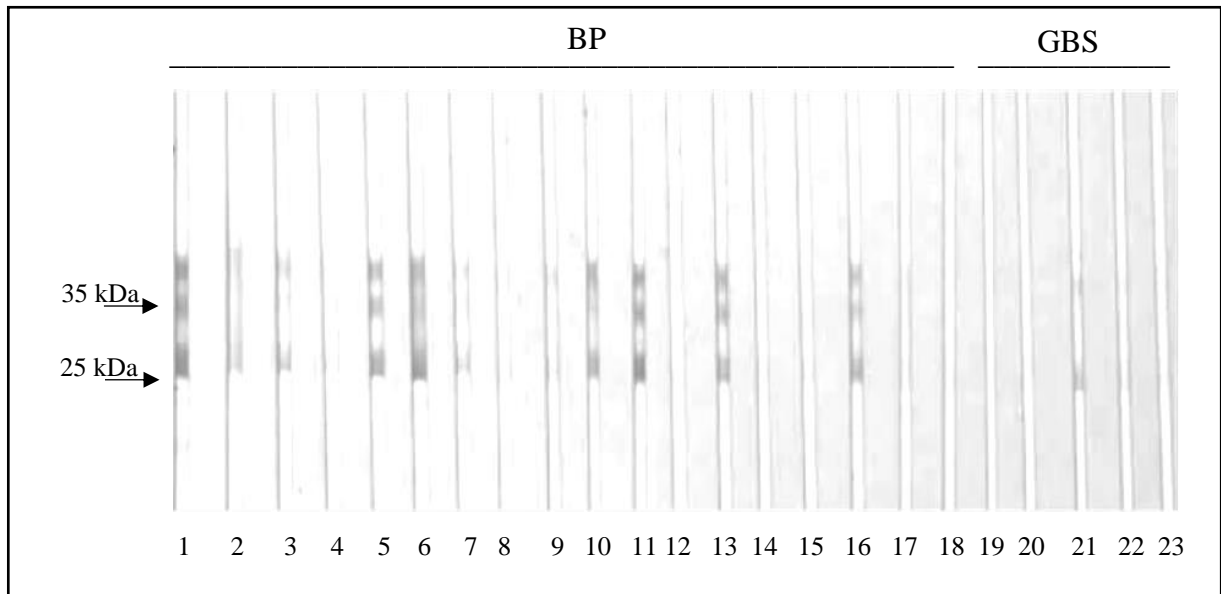


Abb. 24: Repräsentativer Immunblot des BP180(EK) F4

Streifen 1-18 (außer Streifen 4, 8, 12, 14, 15, 17 und 18) weisen als BP Seren eine Bande zwischen 25 und 30 kDa auf. Streifen 19-23 zeigen GBS ohne Reaktivität außer Streifen 21. Links der Abbildung sind die Molekulargewichte in kDa angegeben und durch Pfeile markiert.

5.5 Zusammenfassung der Serumreaktivität

Die 51 bzw. 30 im modifizierten LAD-1 Immunblot reaktiven BP bzw. SHP Seren wurden mit den Proteinsubstraten BP180(VL), BP180(EK) und den BP180(EK) F1-4 getestet (Abb. 25).

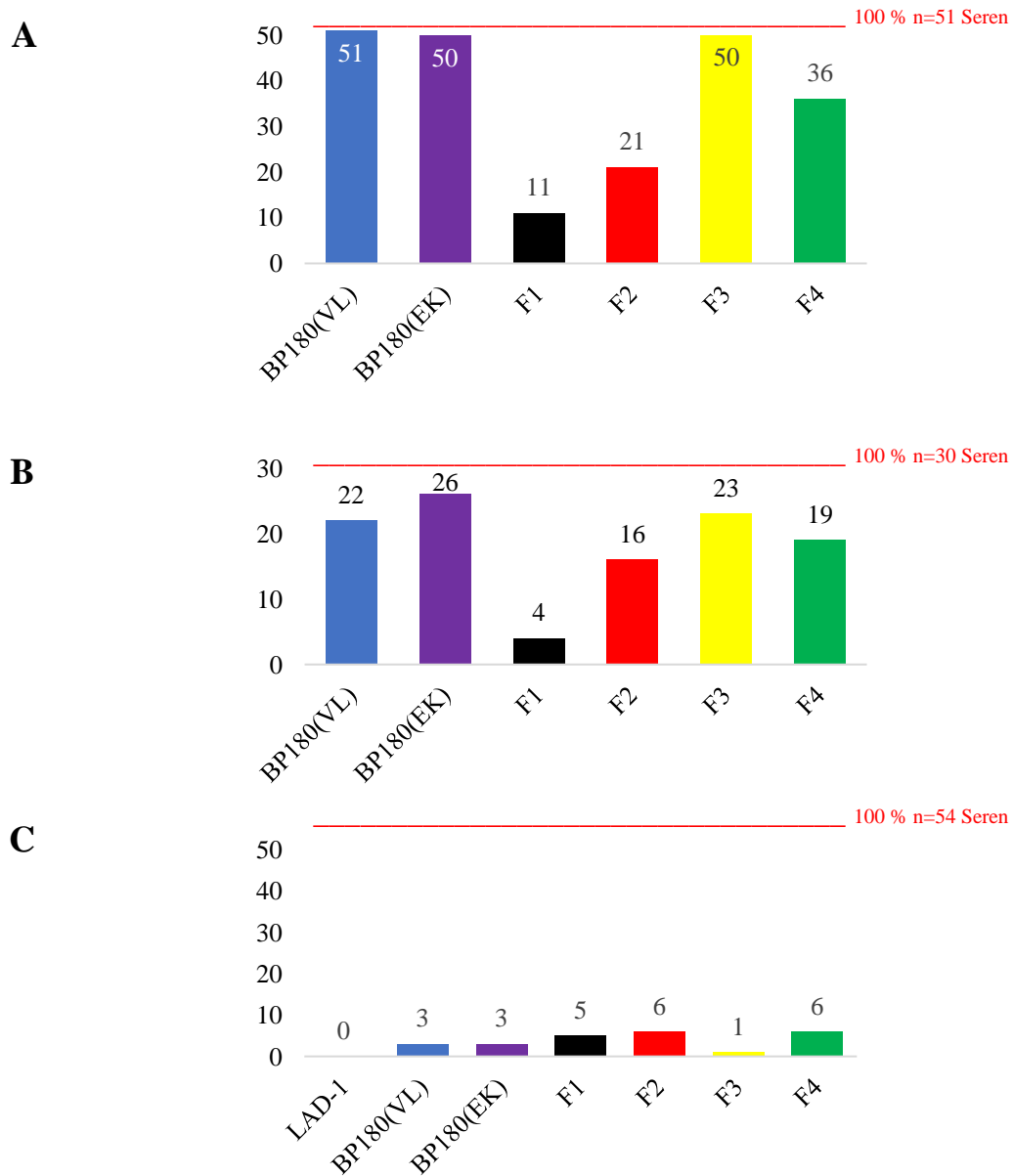


Abb. 25: Reaktivität der Seren von BP (A), SHP (B) und gesunden Blutspendern (C)

Die Diagramme stellen die Reaktivitäten der BP (A), SHP (B) und gesunde Blutspenderseren (GBS, C) mit folgenden Proteinsubstraten dar: BP180(VL) in blau, BP180(EK) in violett, BP180(EK) F1 (F1) in schwarz, BP180(EK) F2 (F2) in rot, BP180(EK) F3 (F3) in grün und BP180(EK) F4 (F4) in gelb. In C ist zudem die Reaktivität der GBS mit LAD-1 dargestellt. Die Skalen links der Diagramme zeigen die Anzahl der getesteten Seren, die Angaben über den Säulen die Anzahl der in den Immunblots reaktiven Seren. Die rote Linie markiert die Anzahl getesteter Seren bei BP, SHP und GBS in Prozent.

Tabelle 19: Tabelle getesteter BP und SHP Seren mit Proteinsubstraten							
	LAD-1	BP180(VL)	BP180(EK)	F1	F2	F3	F4
BP Serum	51/ 51	51/ 51	50/ 51	11/ 51	21/ 51	50/ 51	36/ 51
Reaktivität	(100 %)	(100 %)	(98 %)	(22 %)	(41 %)	(98 %)	(71 %)
SHP Serum	30/ 30	22/ 30	26/ 30	4/ 30	16/ 30	23/ 30	19/ 30
Reaktivität	(100 %)	(73 %)	(87 %)	(13 %)	(53 %)	(77 %)	(63 %)
Gesunde Blutspender	0/ 54	3/ 54	3/ 54	5/ 54	6/54	1/54	6/ 54
Reaktivität	(100 %)	(94 %)	(94 %)	(91 %)	(89 %)	(98 %)	(89 %)

Die BP Seren wiesen mit den Substraten BP180(VL) (51/ 51), BP180(EK) (50/ 51) und F3 (50/ 51) eine 100 bzw. 98 %ige Sensitivität auf. Mit den F1 (11/ 51), 2 (21/ 51) und 4 (36/ 51) dagegen fand sich eine deutlich geringere Sensitivität. Bei SHP ergab sich eine Sensitivität von 87 % (26/ 30) mit BP180(EK), 73 % mit BP180(VL) (22/ 30) und 77 % (23/ 30) mit F3. Mit den F1 (4/ 30), 2 (16/ 30) und 4 (19/ 30) dagegen fand sich eine deutlich geringere SHP Sensitivität. Die Testung der Substrate F3, BP180(VL) und BP180(EK) mit den gesunden Blutspendern ergab eine Spezifität von 98 bzw. 94 %. Mit F1, 2 und 4 zeigten die restlichen Substrate in der Testung Spezifitäten von 91 bzw. 89 %. (Tab. 19).

6. DISKUSSION

Die Heterogenität der Zielantigene durch Auswahl und Überschneidung spezifischer Epitope wie auch methodisch-analytische Unterschiede erschweren bis heute erheblich die Vergleichbarkeit wissenschaftlicher Untersuchungen wie auch die Diagnostik und Differenzierung der bullösen Autoimmundermatosen wie BP und SHP. Daher besteht in der Erweiterung und Optimierung aktueller Testverfahren auf standardisierbare Methoden zur Bestimmung der allgemein verwendeten BP180 Substrate ein wichtiger Schritt zur präzisen Diagnosestellung und validen Zuordnung von Patienten für klinische Studien.

Kommerziell erhältliche ELISA Systeme lassen bei BP Patienten den Nachweis krankheitstypischer Autoantikörper gegen die immundominante 16. nichtkollagene Domäne (NC16A) und BP230 in bisher 85 % bzw. 50-60 % führen. Testkombinationen erhöhen die Rate der Erkennung positiver Patienten auf bis zu 90 % (44, 95, 103–105).

Bei SHP Patienten gelingt der Nachweis BP180-spezifischer Autoantikörper in 75 % der Fälle (54). Eine Autoantikörperreaktivität gegen NC16A findet sich dabei nur in 50 % dieser Patientenseren und gibt einen Hinweis auf die präferierte Reaktion mit C-terminalen Bereichen dieses hemidesmosomalen Proteins (54, 69). Der bis heute hierfür eingesetzte LAD-1 Immunblot wird jedoch als nicht kommerziell verfügbare Nachweismethode nur in wenigen Laboratorien eingesetzt.

Für eine zuverlässige Identifizierung LAD-1-reaktiver, jedoch NC16A-negativer BP und SHP Patienten ergibt sich daher der dringende Bedarf an einer weiterführenden standardisierbaren Autoantikörperdetektion. Diese besteht für die vorliegende Arbeit in der Validierung unterschiedlicher BP180 Zielantigene außerhalb von NC16A in Form von LAD-1 sowie vier eigens für dieses Projekt produzierten Fragmente der BP180 Ektodomäne im Vergleich mit BP180 Ektodomäne, BP180 Vollängenprotein und auch extrazellulärer Matrix in Seren klinisch diagnostizierter BP und SHP Patienten. Hierzu stellte der Immunblot das zentrale Testverfahren dieser Arbeit dar. Diese immunchemische Methode hat sich seit Jahrzehnten in der Wissenschaft zum Nachweis der Spezifität von Antikörpern gegen definierte Antigene bewährt und gilt bis heute als Standard. Darüber hinaus ermöglicht die Verwendung rekombinant hergestellter Fragmente die einfache und schnelle Herstellung reproduzierbarer Substrate als Testmaterial für die durchgeführten Immunblots.

6.1 Weiterentwicklung des LAD-1 Immunblots

Als allgemein geltender Indikator der Autoimmunität BP180-spezifischer NC16A-negativer BP und SHP Seren wurde zunächst die 120 kDa große lösliche Ektodomäne des BP180 Proteins als natives Proteinsubstrat aus Keratinozytenüberstand einer HaCaT Zellkultur für den LAD-1 Immunblot eingesetzt (100). Im Gegensatz zu zahlreichen bisherigen Studien mit Seren von BP und SHP Patienten wurden in der vorliegenden Arbeit Seren mit Autoantikörpern gegen NC16A ausgeschlossen, um die explizite Untersuchung der Autoreaktivität gegen die lösliche Ektodomäne zu gewährleisten. Alle für die weiteren Untersuchungen identifizierten NC16A-negativen Seren zeigten hierbei unerwarteter Weise die reproduzierbare Darstellung einer zweiten Bande im Bereich der bisherigen singulären Proteinmarkierung bei 120 kDa. Diese ergab sich jedoch erst durch die methodische Modifikation in Form einer prolongierten Gelelektrophorese (s. 5.1). Als Ursache für die Darstellung der doppelten Bande stellt sich die Frage, ob diese durch unterschiedliche Molekülgrößen hervorgerufen werden, oder andere molekulare Eigenschaften bei einheitlicher Molekülgröße zum Beispiel durch Matrix- oder Laufmitteleffekte zum entdeckten Phänomen führen.

Die mögliche diagnostische Bedeutung der Doppelbande ergibt sich durch den Vergleich der Ergebnisse mit der aktuellen Literatur. Kromminga et al. zeigte eine Sensitivität von 74 % in BP Seren und somit ein übereinstimmendes Ergebnis für BP mit der vorliegenden Arbeit, in welcher die Sensitivität bei BP bzw. SHP 75 % bzw. 41 % und die Spezifität 100 % beträgt (101). Dagegen reagierten bei Schumann et al. 58 % (29/ 34) der verwendeten BP180(VL)-positiven BP und 100 % der SHP Seren im LAD-1 Immunblot (106). Hierzu vergleichbar beschrieben Schmidt et al. wie auch Kromminga et al. unter Einbeziehung auch NC16A-positiver BP Seren für die gleiche Testmethode eine ebenfalls geringere Sensitivität von nur 58 % im Gegensatz zu der hier vorgestellten modifizierten Methode (107). Die Analyse bezog hierbei auch BP Seren mit NC16A Reaktivität im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit ein. Dieses zeigt, dass die von Schmidt et al. verwendeten Seren möglicherweise eine ausschließliche NC16A-spezifische Reaktivität aufwiesen. Für SHP Seren berichten Schmidt et al. in einer weiteren Studie eine Reaktivität mit LAD-1-spezifischem IgG von nur 16 % (69). Wohingegen in der vorliegenden Arbeit eine deutlich höhere Rate an LAD-1-positiven SHP Seren von 41 % erfasst werden konnte. Der Einsatz des modifizierten LAD-1 Immunblots führt somit bei Verwendung dieses Zielantigens zu signifikant unterschiedlichen Ergebnissen in Bezug auf diesen Teil des geltenden Standards, welche jedoch erst durch die klinischen Krankheitsverläufe ihre Bestätigung finden lassen. Die bestehende Diskrepanz der Ergebnisse

könnte sowohl durch die bisher nicht sicher standardisierte Methode zur Substratgewinnung, wie die Fällung des Überstandes kultivierter HaCaT Keratinozyten als auch mögliche kultivierungsabhängige Einflüsse auf deren biologische Herstellung erklärbar sein. Dennoch bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die maßgebliche Bedeutung von LAD-1 als ein wichtiges BP180 Antigen und weisen auf die Relevanz des LAD-1 Immunblots für die Interpretation der BP und SHP Diagnostik hin. Insbesondere da möglicherweise die neue 120 kDa Bande im modifizierten Immunblot eine präzisere Detektion NC16A-negativer BP und SHP Patienten bedeuten könnte, soweit sich diese Vermutung auch durch klinische Studien bestätigen lässt.

Doch neben IgG Autoantikörpern finden sich auch IgA Autoantikörper gegen BP180 in BP und SHP Seren, welche im Gegensatz zu IgG Autoantikörpern mehrheitlich an die lösliche Ektodomäne und deren C-Terminus binden und damit seltener an NC16A (101, 108). So fungiert der C-Terminus bei 40 % der BP180-spezifischen IgA Autoantikörper als wichtiger Bestandteil des SHP Autoantigenspektrums (109). Wie Schmidt et al. bereits 2001 zeigen konnten, war bei BP180 spezifischen SHP Patienten in 37 % der Fälle eine IgA Autoantikörperreaktivität gegen LAD-1 zu finden (69). Doch aufgrund der großen Anzahl asservierter IgG-positiver LAD-1 Seren in der Klinik für Dermatologie richtet sich der Fokus dieser Arbeit auf die Untersuchung von IgG Antikörpern. Die Testung der gleichen Seren auf ihre Autoantikörperreaktivität der Immunglobulinklasse A im Vergleich von BP und SHP Patienten bleibt dabei nachfolgenden Arbeiten überlassen.

6.2 Reaktivität der BP180 Substrate

6.2.1 BP180(VL) und BP180(EK)

Die Testung der 51 BP und 30 SHP Seren dieser Arbeit mit den bereits vorher generierten rekombinanten Proteinen, BP180(EK) und BP180(VL), bildet zunächst die Grundlage und ermöglicht den nachfolgenden Vergleich mit weiteren eigens für diese Arbeit hergestellten Proteinfragmenten. Die NC16A-enthaltende rekombinante BP180(EK) erreichte hier für BP bzw. SHP Seren im Immunblot eine Sensitivität von 98 % (50/ 51) bzw. 87 % (26/ 30) bei einer Spezifität von 94 % (51/ 54). Doch auch für ELISA Testsysteme kommen unterschiedliche spezifische Regionen der BP180(EK) als Substrate in der BP Diagnostik zur Anwendung. So setzten Mariotti et al. in ihrer Studie an BP Seren eine GST-Fusion der verwendeten Proteinsubstrate ein, welche unter weitgehender Abdeckung des BP180 Epitopspektrums mittels Phagendisplaybibliothek ausgewählt waren. Zur Erfassung der unterschiedlichen

immunogenen Zielregionen des BP180 Proteins wurden neben GST-NC16A auch die Kombinationen aus GST-1080 (AS 1080-1107) und GST-1331 (AS 1331-1404) als ELISA Substrate verwendet. Insgesamt fanden sich bei der Untersuchung von 78 BP Seren mit dieser Methode für NC16A eine Sensitivität von 82 %. Von den 14 NC16A-negativen Seren zeigten hierbei ca. 60 % eine Reaktivität im GST-1080/ 1331 ELISA. Die Kombination beider ELISA ließ die Sensitivität auf 92 % erhöhen bei einer Spezifität von 100 % (110).

Die vorliegende Arbeit dagegen ließ bereits ohne BP180 Fragmentkombination eine höhere Reaktivität von 98 % allein jeweils für BP180(EK) wie auch für F3 (AS 1024-1270) im Immunblot erzielen. Trotz ausschließlich NC16A-negativer BP Seren der vorliegenden Arbeit weisen diese bei einer deutlich höheren Gesamtzahl (n=51) als bei Mariotti et al. eine signifikant höhere Sensitivität (98 % versus 60 %) für F3 auf. Hierzu könnten u. a. Unterschiede in der methodischen Auswahl der BP180(EK) Epitope mittels Phagendisplaybibliothek, der Herstellung der Substrate durch GST-Fusion sowie der angewandten Testmethode mittels ELISA Systeme beigetragen haben. Zudem werden in der vorliegenden Dissertation ausschließlich NC16A-negative BP und SHP Seren untersucht, da deren diagnostisch einzuordnende Reaktivität, wie bereits dargelegt, bis heute ein Problem darstellt. Mit den von Mariotti et al. verwendeten Fusionsproteinen, welche wesentliche Aminosäuresequenzen der auch in dieser Arbeit eingesetzten F3 und F4 Fragmente aufweisen, findet sich dennoch die präferierte BP Autoantikörperreaktivität gegen diese C-terminalen Epitope bestätigt.

Der BP180(VL) Immunblot zeigte bei der Untersuchung NC16A-negativer BP und SHP Seren eine Sensitivität von 100 % bzw. 73 % mit einer Spezifität von 94 %, womit sich die generelle BP180 Autoantikörperaffinität der verwendeten Seren bestätigt findet. Durch Denaturierung des BP180(VL) Proteins und Verwendung des Lämmli-puffers zur Lösung des Proteins während der Aufreinigung war zwar eine exakte kolorimetrische Konzentrationsbestimmung nicht mehr möglich, die angemessene Proteinmenge für den Immunblot ließ sich jedoch durch Titrationsreihen ermitteln. So bestätigt sich, dass hoher Aufwand im biologischen Herstellungsprozess des BP180(VL) Substrates, dessen Aufreinigung (s. 4.3.1.1) und eingeschränkte Reproduzierbarkeit dem generellen Einsatz dieses Immunblots entgegenstehen sowie den Ergebnisvergleich von Studien erschweren.

Die bisherigen Methoden zur Untersuchung der Reaktivität von BP und SHP Seren mit BP180(VL) ergänzen Schmidt et al. durch einen vielversprechenden Ansatz. Hierfür ließen die

Autoren das BP180(VL) Substrat mit Hilfe von Sf21 Insektenzellen exprimieren (107). Die höchste Sensitivität der verwendeten Methoden mit diesem Substrat zur Untersuchung von 65 BP Seren ergab die indirekte Immunfluoreszenz mit 89 % (58/ 65), wohingegen im Immunblot nur 60 % (39/ 65) erreicht wurden. SHP Seren wurden im Sf21 basierten Immunfluoreszenztest zu 86 % (6/ 7) detektiert. Unspezifische Bindungen der verwendeten Negativkontrollen konnten durch Präadsorption mit nicht infizierten Sf21 Insektenzellen verhindert werden (107). Die vorliegende Arbeit lässt mittels BP180(VL) Immunblot dagegen eine BP bzw. SHP Sensitivität von 100 % bzw. 73 % unter Einbeziehung ausschließlicher NC16A-negativer 51 BP bzw. 30 SHP Seren erreichen. Wobei zur Herstellung des BP180(VL) Substrats in der vorliegenden Arbeit HEK293 Zellen, und ein proteingebundener FLAG-Tag zur Detektion eingesetzt wurden (s. 4.2.4).

Izumi et al. untersuchten die Reaktivität von BP sowie SHP Seren im BP180(VL) ELISA. Hierbei erfolgte die vergleichende Erfassung der Reaktivität von BP Seren mittels konventionellem NC16A ELISA und BP180(VL) ELISA (111). Die Sensitivität des BP180(VL) ELISA von 83,5 % wie auch dessen Spezifität von 94,3 % an insgesamt 122 Patientenserum fanden sich dabei in etwa gleicher Höhe wie der NC16A ELISA mit einer Sensitivität von 82,6 % bzw. einer Spezifität von 93,3 %. Während 72 % der Seren sowohl im NC16A als auch im BP180(VL) ELISA reagierten, waren nur 10,7 % der BP Seren ausschließlich mit NC16A und 11,6 % mit BP180(VL) reaktiv. Dagegen ließ sich in der vorliegenden Arbeit eine mit 100 % wesentlich höhere Sensitivität für BP Seren im BP180(VL) Immunblot finden. Zudem ließ sich bei Izumi et al. an Hand eines Immunblots die spezifische Autoantikörperreaktivität der Anti-BP180(VL) Antikörper gegen die zentrale Region der Ektodomäne in BP Seren nachweisen, auch bei negativem NC16A ELISA. Dieses Phänomen findet sich unter Verwendung von F3 zur Immunogenität verschiedener Epitope des mittleren Bereiches der BP180(EK) in NC16A-negativen BP Seren in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Als Ursache für die unterschiedliche Rate reaktiver Seren lässt sich u. a. die Ausprägung der im Krankheitsverlauf variierenden inflammatorischen Reaktion als Einflussfaktor diskutieren. Hiernach wäre zu vermuten, dass Autoantikörper in hochakuten Krankheitsphasen des BP zellwandnahe und damit NC16A-beinhaltende Regionen, bei weniger entzündlichen eher die mittlere extrazelluläre Domäne des BP180 Proteins attackieren (111).

Mit einer weiteren Studie von Izumi et al. über die Entwicklung eines SHP BP180(VL) ELISA wird als Substrat ein aus HEK293 Zellen hergestelltes rekombinantes BP180(VL) Protein

eingesetzt und an 12 SHP Patientenseren geprüft (112). Hierbei wird eine Reaktivität mit BP180(VL) in 75 % beschrieben. Im Gegensatz dazu ließen sich mittels konventionellem NC16A ELISA nur 5 der 12 Seren als positiv detektieren. Alle 8 SHP Seren, welche zuvor in der indirekten Immunfluoreszenz am epidermalen Blasendach gebunden hatten, reagierten jedoch im BP180(VL) ELISA, nur 6 davon im BP180(VL) Immunblot (75 %) (112). Der vorgestellte BP180(VL) ELISA scheint somit eine nicht nur relativ sensitive Methode zur Detektion spezifischer SHP Antikörper zu bieten, sondern weist mit 94,3 % (115/ 122) auch eine hohe Spezifität auf. Die postulierte Überlegenheit des immunchemischen Befundes relativiert sich jedoch durch die geringe Fallzahl im Vergleich zur vorliegenden Arbeit. Hierbei wies der Immunblot eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität von 73 % bzw. 94 % bei einer fast dreifachen Anzahl von SHP Seren auf und analysiert ausschließlich LAD-1-reaktive, jedoch NC16A-negative Seren bei entsprechender klinischer Diagnose.

6.2.2 BP180(EK) Fragmente 1-4

Die Aufmerksamkeit liegt seit vielen Jahren auf der fraglichen Immundominanz weiterer extrazellulärer BP180 Proteindomänen außerhalb von NC16A. Dabei ist die exakte Zuordnung extrazellulärer Epitope mit Hilfe von prokaryotischen und eukaryotischen rekombinanten Fragmenten Gegenstand der Forschung. Zur Validierung der hier untersuchten Substrate F1-4, BP180(EK) und BP180(VL) an 51 BP, 30 SHP und 54 Kontrollseren wurden Immunblots eingesetzt. Da die initial geplante Expression der Fragmente 1-4 mit Hilfe von *E. coli* kein ausreichendes Ergebnis erzielen ließ, erfolgte diese unter Einsatz einer HEK293 Kultur bei jedoch geringerer Proteinausbeute. Jedes einzelne der 4 rekombinanten Proteine war zur Aufreinigung mit einem His-Tag versehen, um das Risiko unspezifischer Reaktivität im Immunblot zu minimieren.

Die Reaktivität des F1 (AS 563-807) lag mit 22 % bzw. 13 % für BP bzw. SHP Seren deutlich unter den weiteren BP180 Fragmenten. Dagegen ergab sich für F2 (AS 793-1039) eine Reaktivität von 41 % bzw. 53 % der BP bzw. SHP Seren, wobei dieses Fragment als einziges der 4 untersuchten Proteinfragmente SHP Seren bevorzugt erkennen ließ. Diese Affinität an den zentralen Bereich der BP180(EK) steht im Gegensatz bisheriger Daten über die C-terminale Tendenz der SHP Autoantikörperreaktivität (72). Die erreichte Spezifität von nur 91 % bzw. 89 % für F1 bzw. F2 im Immunblot könnte auf eine höhere Störanfälligkeit der Methode hinweisen.

Bei der Testung der BP Seren zeigte F3 (AS 1024-1270) die höchste Sensitivität der untersuchten BP180 Fragmente. Die Erfassung von 98 % der BP Seren entsprach damit der Sensitivität der BP180 Ektodomäne (98 %) und war nur geringfügig niedriger als die des BP180(VL) (100 %), ebenso bezüglich der Spezifität. Durch die hohe Sensitivität des Immunblots von F3 mit Autoantikörpern in sowohl BP als auch SHP Seren werden vorbeschriebene wissenschaftliche Beobachtungen (s. unten) bestätigt und erweitert: (i) Die Autoantikörper reagieren neben NC16A und intrazellulären Domänen gegen diverse extrazelluläre Epitope. (ii) die zentrale extrazelluläre Region von BP180 enthält autoantigene Epitope und (iii) F3 erweist sich für eine Testentwicklung NC16A-negativer und LAD-1-positiver BP und SHP Seren als geeignetes Substrat.

F4 (AS 1255-1497) als epitopübergreifendes Fragment der C-terminalen Region von BP180 zeigte mit 71 % bzw. 63 % IgG Reaktivität für BP bzw. SHP Antikörper mit einer Spezifität von 89 % die zweithöchste Sensitivität nach F3, insbesondere für SHP Seren. Dies bestätigte die in der Literatur bereits beschriebene besondere Interaktion zwischen BP und SHP Seren mit der C-terminalen BP180 Domäne. Wie bereits in 6.2 diskutiert, handelte es sich auch bei der Analyse der Fragmente um die Selektion ausschließlich NC16A-negativer Seren, welche die Arbeit im Gegensatz von der bisherigen Literatur grundsätzlich unterscheidet. Auch verwendeten andere Autoren (72, 109) im Rahmen der Testung der Autoantikörper mit BP180 Proteinsubstraten Glutathion-S-Transferase (GST-) fusionierte-Proteine im Gegensatz zur Expression der BP180 Fragmente in HEK293 Zellen wie in der vorliegenden Arbeit. Die Expression der eukaryotischen Polypeptide mit Hilfe von *E. coli* Bakterien als Fusionsprodukte an Hand einer GST wurde 1988 durch Smith et al. etabliert (113). Seitdem dienen GST-Fusionsproteine in vielen Arbeiten als Substrate für BP180 Fragmente.

Balding et al. arbeiteten bei der Testung von SHP und BP Seren mit verschiedenen rekombinanten extrazellulären BP180 Proteinen. Hierbei stellt GST-S Δ 1 (AS 542-583) ein NC16A Epitop dar, welches bereits mehrere Jahre zuvor bei Giudice et al. Anwendung fand (114). GST-133 (AS 1365-1497), GST-4710 (AS 1365-1458) und GST-4575 (AS 1365-1413) sind dagegen in der C-terminalen Region lokalisiert. 16 von 23 (70 %) SHP Seren reagierten mit mindestens einem der BP180 Epitope. Hiervon zeigten 2 Reaktivität gegen GST-S Δ 1 und 4 Seren gegen C-terminale Epitope. 10 der Seren detektierten NC16A und C-terminale Regionen gleichzeitig. Bei Balding et al. fand sich bei einer Spezifität von 100 % für 11 von 14 BP Seren (79 %) eine GST-S Δ 1 Reaktivität, wobei diese für 6 dieser Seren mit den

C-terminalen Epitopen nur schwach ausgeprägt war. Die vorliegende Arbeit übertrifft die SHP und BP Reaktivität bereits gegen singuläre Epitope der BP180 Ektodomäne, insbesondere F3 mit 77 % bzw. 98 %, ohne Verwendung NC16A-positiver Substrate.

Die Ergebnisse Baldings konnten in der Folge bestätigt werden. Murakami et al. verwendeten bei der Immunblotanalyse von Antikörpern in 50 SHP Seren ebenfalls die Fusionsproteine GST-NC16A, GST-133 und GST-4575 (94). 36 % (18/ 50) der SHP Seren reagierten mit NC16A. Dagegen reagierten 20 der 50 (40 %) verwendeten SHP Seren mit GST-133 und 15 der 50 (30 %) mit GST-4575. 93 % (14/ 15) der BP Seren reagierten mit GST-NC16A. Von den 15 verwendeten BP Seren reagierten dagegen nur 5 (33 %) mit GST-133 und 3 (20 %) mit GST-4575. Somit konnte einmal mehr die besondere NC16A Affinität der BP Seren im Unterschied zu SHP Seren gezeigt werden. Umgekehrt detektierten die SHP Seren eher C-terminale Anteile von BP180 (94). Dagegen findet sich in der vorliegenden Arbeit für ausschließlich NC16A negative BP Seren (n=51) im Immunblot des C-terminalen Fragments 4 eine mit 71 % ähnliche Reaktivität wie für SHP Seren (63 %). Eine weitere Erklärung für die geringe NC16A Bindung von SHP Seren könnte in der C-terminalen Präferenz oder in der grundsätzlich niedrigeren Antikörperkonzentration im Gegensatz zu BP Seren liegen, was wiederum in der Hälfte der Fälle zu einer negativen IIF führt (47).

Auch Nie und Hashimoto et al. setzten drei prokaryotische GST-Fusionsproteine der C-terminalen Domäne von BP180 ein (109). Die verwendeten BP Seren zeigten IgG Ablagerungen, und die SHP Seren sowohl IgG als auch IgA Ablagerungen an der DEJ in der DIF. Von 20 verwendeten BP Seren reagierten 17 (85 %) und 5 der 10 verwendeten SHP Seren (50 %) mit GST-1050 (AS 542-892). Neben der Verwendung des GST-963 (AS 885-1206) mit einer Reaktivität von 25 % (5/ 20) der BP und 10 % (1/ 10) der SHP Seren, wurde zudem mit GST-915 ein Fusionsprotein mit einer C-terminalen Aminosäuresequenz (1227-1532) eingesetzt. Gegen Letzteres zeigten BP bzw. SHP Seren eine Reaktivität von 30 % (6/ 20) bzw. 50 % (5/ 10) (109).

Bei dem weitreichenden Epitopspektrum dieser Arbeit bestätigt sich insbesondere für NC16A-enthaltende Substrate die allgemein höhere Reaktivität von BP im Gegensatz zu SHP Seren. Hier entspricht die geringe F1 (AS 563-807) Reaktivität der vorliegenden Arbeit dem sicheren Ausschluss der immunreaktiven NC16A Domäne. Der F2 Immunblot der vorliegenden Arbeit zeigte eine mit dem GST-1050 Immunblot vergleichbare Reaktivität der SHP Seren, wobei

auch hier NC16A-positive Seren von Nie und Hashimoto et al. analysiert wurden. Somit könnte sich die bevorzugte SHP Reaktivität mit F2 möglicherweise als Bestandteil eines krankheitstypischen Epitopmusters erweisen. Obwohl 182 Aminosäuren des GST-963 mit dem sensitiven F3 (AS 1024-1270) übereinstimmten, reagierten deutlich weniger BP und SHP Seren mit diesem Fusionsprotein. Möglicherweise liegt die Ursache hierfür in der von Nie und Hashimoto et al. getroffenen Auswahl auch NC16A-positiver Seren und dem vorliegenden individuellen Krankheitsgeschehen der Patienten. Die eigene Immunblotanalyse von F4 zeigte mit 63 % eine vergleichbare SHP Reaktivität wie die von GST-915 als C-terminales Substrat. Nicht zuletzt bleiben auch Unterschiede in der Herstellung der Proteine, deren Peptidsequenzen und der eingesetzten Seren im Vergleich zur zitierten Literatur bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen.

Bei der Untersuchung autoantigener BP180 Epitope testeten Schumann et al. 43 BP und 6 SHP Seren unter anderem mit LAD-1 und den eukaryotischen rekombinanten BP180 Proteinen Col15 (AS 567-807) und Ecto2 (AS 1175-1497) im Immunblot. Hierbei zeigten 79 % der BP und 100 % der SHP Seren Reaktivität im BP180(VL) Immunblot, davon 32 % bzw. 50 % der BP und jeweils 50 % der SHP Seren mit Col15 bzw. Ecto2 bei einer Spezifität von 100 %. (106). Die C-terminale Affinität der BP sowie SHP Antikörper liegt in genannter Studie in ähnlicher Ausprägung vor, wobei im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit (n=30) die geringe Anzahl von 6 verwendeten Seren die Validität der Aussage begrenzt. Dabei stehen die Reaktivitätsmuster der BP sowie SHP Seren in Übereinstimmung mit der ausgeprägten C-terminalen Affinität in der vorliegenden Arbeit, in welcher sich jedoch eine deutlich höhere BP Reaktivität mit F3 bzw. F4 mit 98 % bzw. 71 % findet. Obwohl Schumann et al. in Col15 ein bislang möglicherweise unbekanntes immundominantes Epitop identifiziert haben könnten, ergab jedoch die vorliegende Arbeit eine niedrige F1 Sensitivität (AS 563-807) für BP und SHP Seren trotz vergleichbarer Aminosäurestrukturen der beiden Epitope. Als Erklärungen hierfür könnten einerseits die Interaktion des Col15 mit β 1 Integrin und adhäsive Eigenschaften epithelialer und fibroblastischer Zelllinien der Kollagendomäne dienen, sowie andererseits die Testung NC16A-negativer Seren der vorliegenden Arbeit (115).

Um neue Erkenntnisse über die humorale Immunantwort bei Vorliegen eines BP zu gewinnen, generierten Di Zenzo et al. eine Phagendisplaybibliothek für die Charakterisierung und Erfassung verschiedener BP180 Epitope mit Hilfe monoklonaler Antikörper (116). Bei der Untersuchung der BP Seren kamen unter anderem die Epitope mit den AS 508-541 (NC16A)

sowie AS 915-985 und AS 1080-1107 zur Anwendung. Hierbei zeigten 60 % der verwendeten BP Seren Reaktivität mit NC16A, 37 % (21/ 57) reagierten mit außerhalb gelegenen Bereichen. 23 % der BP Seren detektierten die 2 Epitope der mittleren extrazellulären Region von BP180, wobei sich in 14 % bzw. 9 % der BP Seren Reaktivität mit dem Epitop 915 bzw. 1080 zeigte (116). Im Einklang hierzu findet sich die bereits beschriebene BP Reaktivität (25 %) der mittleren extrazellulären Region (Substrat GST-963) durch Nie und Hashimoto et al. (109). Außerdem reagierten bei Di Zenzo et al. 16 % (9/ 57) der BP Seren mit zwei sich überlappenden C-terminalen BP180 Proteinen (AS 1331-1404 und AS 1354-1406), vergleichbar zu den Ergebnissen des von Murakami et al. verwendeten GST-133 (94). Darüber hinaus bestätigt die vorliegende Arbeit trotz Ausschluss NC16A-positiver Seren die erhöhte BP Reaktivität mit extrazellulären Bereichen außerhalb von NC16A, wobei die dargestellte hohe BP Reaktivität mit F3 die Existenz einer weiteren immundominanten BP180 Region postulieren lässt.

Abschließend bleibt festzustellen, dass im Vergleich zur zitierten Literatur die vorliegende Arbeit die BP180 Reaktivität mit extrazellulären Regionen außerhalb von NC16A in Seren von BP sowie SHP Patienten grundsätzlich bestätigt (45, 94, 106, 109). Vorherige Studien ließen bereits das Antigenpotenzial der extrazellulären Domäne außerhalb von NC16A mit IgG Antikörpern von BP Patienten im Immunblot erkennen, jedoch weist die BP Reaktivität von F3 mit 98 % in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu den sich teilweise überschneidenden Domänen von Di Zenzo, Nie und Hashimoto eine deutlich höhere Sensitivität auf. Darüber hinaus gelang der Nachweis einer qualitativen Optimierung der Detektion von Autoantikörpern gegen C-terminale BP180 Epitope anhand der rekombinanten Fragmente 3 und 4 als potentielle Kandidaten krankheitstypischer serologischer Autoantikörpermuster bei einer erstmals demonstrierten IgG Reaktivität der SHP NC16A-negativen Seren von 77 % für F3.

6.3 Limitationen

Bei den Proben handelte es sich nicht um einzeln vorgetestete, sondern um native Patientenseren, welche unabhängig vom Krankheitsstadium und der Antikörpermenge asserviert wurden und zur Verwendung kamen. Hierdurch sind mögliche falsch-negative Ergebnisse nicht auszuschließen. Darüber hinaus könnten Probengewinnung, Lagerung, Transport oder auch Probenvorbereitung zu negativen präanalytischen Effekten auf die Qualität der Patientenseren und somit die Ergebnisse geführt haben. Zudem könnten individuell vorbestehende Blutserumveränderungen aufgrund von Matrixeffekten zu Störungen der Serumanalysen untersuchter Patienten wie auch gesunder Spender geführt haben. Auch sind

Einflüsse durch einen Altersunterschied zwischen Patienten und Kontrollgruppe nicht ausgeschlossen.

Bezüglich der Spezifitätsberechnung der Autoantikörpernachweise werden die Ergebnisse jeweils allein auf die Gruppe von BP oder SHP Seren mit den Seren gesunder Spender verglichen und nicht mit der Summe der Seren gesunder Spender unter Einbeziehung der jeweils anderen Entität, da bis heute keine zuverlässige Differenzierung von BP und SHP möglich ist.

6.4 Ausblick

Die beschriebenen Ergebnisse der Dissertationsarbeit können als Grundlage für die Entwicklung neuer kommerziell erhältlicher diagnostischer Testsysteme dienen. Mit Hilfe eines neuen ELISA oder BIOCHIP® Mosaiks mit Fragment 3 als Antigen könnte eine bis heute bestehende diagnostische Lücke bei der Identifizierung NC16A-negativer und LAD-1-positiver BP und SHP Patienten geschlossen werden. Die geringe Größe des BP180 Fragments könnte sich dabei als Vorteil bei Verwendung im ELISA erweisen, da große Proteinsubstrate bei dieser Methode mit einer erniedrigten Sensitivität assoziiert sind (117). Auch könnten sich durch eine Modifikation der bestehenden Fragmente der BP180 Ektodomäne alternative Testmethoden ergeben. Als besonders vielversprechend könnte sich auch die Fusion der beiden sensitivsten Fragmente 3 und 4, oder die Kombination mit der bekannten immundominanten Domäne NC16A für die diagnostische Verwendung erweisen. Mit Entdeckung der neuen 120 kDa Bande und damit einer höheren Differenzierbarkeit des bisherigen LAD-1 Immunblots könnte sich eine potentiell präzisere Diagnostik NC16A-negativer BP und SHP Patienten bieten. Dieses jedoch setzt zunächst die Validierung des modifizierten LAD-1 Immunblots von BP180 voraus.

BP und SHP Patientenserum enthalten neben IgG häufig auch IgA Autoantikörper gegen BP180 (101). SHP Patienten weisen vermehrt IgA Antikörper im Serum auf, welche mehrheitlich an die lösliche Ektodomäne und im Gegensatz zu IgG seltener NC16A binden. Der C-Terminus fungiert bei 40 % der BP180-spezifischen IgA Autoantikörper als wichtiges SHP Autoantigen (109). Schmidt et al. zeigten, dass bei 37 % der BP180 reaktiven SHP Patienten IgA Autoantikörperreaktivität gegen LAD-1 besteht (69). Die Testung von IgA Antikörpern gegen die BP180 Fragmente bei Patienten mit SHP oder linearer IgA-Dermatose ist derzeit Gegenstand einer weiteren Inauguraldissertation.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Schmidt E, Zillikens D. 2013. Pemphigoid diseases. *Lancet*. 381(9863):320–32.
2. Amber KT, Murrell DF, Schmidt E, Joly P, Borradori L. 2018. Autoimmune subepidermal bullous diseases of the skin and mucosae: clinical features, diagnosis, and management. *Clin Rev Allergy Immunol*. 54(1):26–51.
3. Hübner F, Recke A, Zillikens D, Linder R, Schmidt E. 2016. Prevalence and age distribution of pemphigus and pemphigoid diseases in Germany. *J Invest Dermatol*. 136(12):2495–8.
4. Lever WF. 1953. Pemphigus. *Medicine (Baltimore)*. 32(1):1–123.
5. Jordon RE, Beutner EH, Witebsky E, Blumental G, Hale WL, Lever WF. 1967. Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. *JAMA J Am Med Assoc*. 200(9):751–6.
6. Schmidt E, Kasperkiewicz M, Joly P. 2019. Pemphigus. *Lancet*. 394(10201):882–94.
7. Reunala T, Salmi TT, Hervonen K, Kaukinen K, Collin P. 2018. Dermatitis herpetiformis: a common extraintestinal manifestation of coeliac disease. *Nutrients*. 10(5):602.
8. Bertram F, Bröcker EB, Zillikens D, Schmidt E. 2009. Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *J Dtsch Dermatol Ges*. 7(5):434–40.
9. van Beek N, Schumacher N, Rose C, Schmidt E, Zillikens D. 2020. Modern diagnostics of autoimmune bullous diseases. *Pathologe*. 41(4):317–25.
10. Langan S, Smeeth L, Hubbard R, Fleming K, Smith C, West J. 2008. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ*. 337(7662):160–3.

11. Joly P, Baricault S, Sparsa A, Bernard P, Bédane C, Duvert-Lehembre S, et al. 2012. Incidence and mortality of bullous pemphigoid in France. *J Invest Dermatol.* 132(8):1998–2004.
12. Langan SM, Groves RW, West J. 2011. The relationship between neurological disease and bullous pemphigoid: a population-based case-control study. *J Invest Dermatol.* 131(3):631–6.
13. Bastuji-Garin S, Joly P, Lemordant P, Sparsa A, Bedane C, Delaporte E, et al. 2011. Risk factors for bullous pemphigoid in the elderly: a prospective case-control study. *J Invest Dermatol.* 131(3):637–43.
14. Lee J, Seiffert-Sinha K, Attwood K, Sinha AA. 2019. A retrospective study of patient-reported data of bullous pemphigoid and mucous membrane pemphigoid from a US-based registry. *Front Immunol.* 10(9):1–11.
15. Hübner F, König IR, Holtsche MM, Zillikens D, Linder R, Schmidt E. 2020. Prevalence and age distribution of pemphigus and pemphigoid diseases among paediatric patients in Germany. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 34(11):2600–5.
16. Parker SRS, Dyson S, Brisman S, Pennie M, Swerlick RA, Khan R, et al. 2008. 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.* 59(4):582–8.
17. Rzany B, Partscht K, Jung M, Kippes W, Mecking D, Baima B, et al. 2002. Risk factors for lethal outcome in patients with bullous pemphigoid: low serum albumin level, high dosage of glucocorticosteroids, and old age. *Arch Dermatol.* 138(7):903–8.
18. Jung M, Kippes W, Messer G, Zillikens D, Rzany B. 1999. Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: a population-based study on incidence. *J Am Acad Dermatol.* 41(2 I):266–8.
19. Joly P, Benichou J, Lok C, Hellot M, Saiag P, Tancrede-Bohin E, et al. 2005.

- Prediction of survival for patients with bullous pemphigoid: a prospective study. *Arch Dermatol.* 141(6):691–8.
20. Holsche MM, Goletz S, van Beek N, Zillikens D, Benoit S, Harman K, et al. 2018. Prospective study in bullous pemphigoid: association of high serum anti-BP180 IgG levels with increased mortality and reduced Karnofsky score. *Br J Dermatol.* 179(4):918–24.
 21. Schulze F, Neumann K, Recke A, Zillikens D, Linder R, Schmidt E. 2015. Malignancies in pemphigus and pemphigoid diseases. *J Invest Dermatol.* 135(5):1445–7.
 22. Di Zenzo G, Marazza G, Borradori L. 2007. Bullous pemphigoid: physiopathology, clinical features and management. *Adv Dermatol.* 23:257–88.
 23. Schmidt E, Della Torre R, Borradori L. 2012. Clinical features and practical diagnosis of bullous pemphigoid. *Immunol Allergy Clin North Am.* 32(2):217–32.
 24. Gammon WR, Briggaman RA. 1993. Bullous SLE: a phenotypically distinctive but immunologically heterogeneous bullous disorder. *J Invest Dermatol.* 100(1):28–34.
 25. Schulze F, Kasperkiewicz M, Zillikens D, Schmidt E. 2013. Bullöses Pemphigoid. *Hautarzt.* 64(12):931–45.
 26. Murrell DF, Daniel BS, Joly P, Borradori L, Amagai M, Hashimoto T, et al. 2012. Definitions and outcome measures for bullous pemphigoid: recommendations by an international panel of experts. *J Am Acad Dermatol.* 66(3):479–85.
 27. Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, et al. 1993. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest.* 92(5):2480–8.
 28. Heimbach L, Li Z, Berkowitz P, Zhao M, Li N, Rubenstein DS, et al. 2011. The C5a

- receptor on mast cells is critical for the autoimmune skin-blistering disease bullous pemphigoid. *J Biol Chem.* 286(17):15003–9.
29. Karsten C, Beckmann T, Holtsche M, Tillmann J, Tofern S, Schulze F, et al. 2018. Tissue destruction in bullous pemphigoid can be complement independent and may be mitigated by C5aR2. *Front Immunol.* 9(3):488.
 30. Ujiie H, Sasaoka T, Izumi K, Nishie W, Shinkuma S, Natsuga K, et al. 2014. Bullous pemphigoid autoantibodies directly induce blister formation without complement activation. *J Immunol.* 193(9):4415–28.
 31. Sitaru C, Schmidt E, Petermann S, Munteanu LS, Bröcker EB, Zillikens D. 2002. Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *J Invest Dermatol.* 118(4):664–71.
 32. Schmidt E, Obe K, Bröcker EB, Zillikens D. 2000. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol.* 136(2):174–8.
 33. Haeberle S, Wei X, Bieber K, Goletz S, Ludwig RJ, Schmidt E, et al. 2018. Regulatory T-cell deficiency leads to pathogenic bullous pemphigoid antigen 230 autoantibody and autoimmune bullous disease. *J Allergy Clin Immunol.* 142(6):1831–42.
 34. Makita E, Matsuzaki Y, Fukui T, Matsui A, Minakawa S, Nakano H, et al. 2021. Autoantibodies to BPAG1e trigger experimental bullous pemphigoid in mice. *J Invest Dermatol.* 141(5):1167–76.
 35. Goletz S, Zillikens D, Schmidt E. 2017. Structural proteins of the dermal-epidermal junction targeted by autoantibodies in pemphigoid diseases. *Exp Dermatol.* 26(12):1154–62.
 36. Li K, Sawamura D, Giudice GJ, Diaz LA, Mattei MG, Chu ML, et al. 1991. Genomic organization of collagenous domains and chromosomal assignment of human 180-kDa bullous pemphigoid antigen-2, a novel collagen of stratified squamous epithelium. *J*

- Biol Chem. 266(35):24064–9.
37. Giudice GJ. 1992. Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J Invest Dermatol.* 99(3):243–50.
 38. Masunaga T, Shimizu H, Yee C, Borradori L, Lazarova Z, Nishikawa T, et al. 1997. The extracellular domain of BPAG2 localizes to anchoring filaments and its carboxyl terminus extends to the lamina densa of normal human epidermal basement membrane. *J Invest Dermatol.* 109(2):200–6.
 39. Döpp R, Schmidt E, Chimanovitch I, Leverkus M, Bröcker EB, Zillikens D. 2000. IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in bullous pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *J Am Acad Dermatol.* 42(4):577–83.
 40. Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Calabresi V, Fontao L, Hofmann SC, Lacour JP, et al. 2011. Demonstration of epitope-spreading phenomena in bullous pemphigoid: results of a prospective multicenter study. *J Invest Dermatol.* 131(11):2271–80.
 41. Stanley JR, Tanaka T, Mueller S, Klaus-Kovtun V, Roop D. 1988. Isolation of complementary DNA for bullous pemphigoid antigen by use of patients' autoantibodies. *J Clin Invest.* 82(6):1864–70.
 42. Stanley JR, Hawley-Nelson P, Yuspa SH, Shevach EM, Katz SI. 1981. Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell.* 24(3):897–903.
 43. Koster J, Geerts D, Favre B, Borradori L, Sonnenberg A. 2003. Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin $\alpha 6\beta 4$ important for hemidesmosome assembly. *J Cell Sci.* 116(2):387–99.
 44. Blöcker IM, Dähnrich C, Probst C, Komorowski L, Saschenbrecker S, Schlumberger W, et al. 2012. Epitope mapping of BP230 leading to a novel enzyme-linked immunosorbent assay for autoantibodies in bullous pemphigoid. *Br J Dermatol.*

166(5):964–70.

45. Skaria M, Jaunin F, Hunziker T, Riou S, Schumann H, Bruckner-Tuderman L, et al. 2000. IgG autoantibodies from bullous pemphigoid patients recognize multiple antigenic reactive sites located predominantly within the B and C subdomains of the COOH-terminus of BP230. *J Invest Dermatol.* 114(5):998–1004.
46. Kromminga A, Sitaru C, Hagel C, Herzog S, Zillikens D. 2004. Development of an ELISA for the detection of autoantibodies to BP230. *Clin Immunol.* 111(1):146–52.
47. Schmidt E, Groves R. 2016. Immunobullous diseases. 9th ed. Griffith C, Barker J, Chalmers R, Bleiker T, Creamer D, (Eds). *Rook's Textbook of Dermatology part 3, chapter 50.* Chichester: Wiley-Blackwell: 1–56.
48. Bernard P, Vaillant L, Labeille B, Bedane C, Arbeille B, Denoeux JP, et al. 1995. Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three french regions. *Arch Dermatol.* 131(1):54–6.
49. Yeh SW, Ahmed B, Sami N, Ahmed AR. 2003. Blistering disorders: diagnosis and treatment. *Dermatol Ther.* 16(3):214–23.
50. Chan LS, Ahmed AR, Anhalt GJ, Bernauer W, Cooper KD, Elder MJ, et al. 2002. The first international consensus on mucous membrane pemphigoid: definition, diagnostic criteria, pathogenic factors, medical treatment, and prognostic indicators. *Arch Dermatol.* 138(3):370–9.
51. Ahmed, A.R., Kurgis, B.S., Rogers RS. 1991. Cicatricial pemphigoid. *J Am Acad Dermatol.* 24(6):987–1001.
52. Thorne JE, Anhalt GJ, Jabs DA. 2004. Mucous membrane pemphigoid and pseudopemphigoid. *Ophthalmology.* 111(1):45–52.
53. Saw VPJ, Dart JKG. 2008. Ocular mucous membrane pemphigoid: diagnosis and management strategies. *Ocul Surf.* 6(3):128–42.

54. Oyama N, Setterfield JF, Powell AM, Sakuma-Oyama Y, Albert S, Bhogal BS, et al. 2006. Bullous pemphigoid antigen II (BP180) and its soluble extracellular domains are major autoantigens in mucous membrane pemphigoid: the pathogenic relevance to HLA class II alleles and disease severity. *Br J Dermatol.* 154(1):90–8.
55. Chan LS, Hammerberg C, Cooper KD. 1997. Significantly increased occurrence of HLA-DQB1(*)0301 allele in patients with ocular cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 108(2):129–32.
56. Setterfield JF, Theron J, Vaughan RW, Welsh KI, Mallon E, Wojnarowska F, et al. 2001. Mucous membrane pemphigoid: HLA-DQB1*0301 is associated with all clinical sites of involvement and may be linked to antibasement membrane IgG production. *Br J Dermatol.* 145(3):406–14.
57. Yunis JJ, Mobini N, Yunis EJ, Alper CA, Deulofeut R, Rodriguez A, et al. 1994. Common major histocompatibility complex class II markers in clinical variants of cicatricial pemphigoid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(16):7747–51.
58. Sadik CD, Bischof J, van Beek N, Dieterich A, Benoit S, Sárdy M, et al. 2017. Genomewide association study identifies GALC as susceptibility gene for mucous membrane pemphigoid. *Exp Dermatol.* 26(12):1214–20.
59. Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, Mutasim DF, Diaz LA. 1986. Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. *J Immunol.* 136(4):1231–5.
60. Leverkus M, Schmidt E, Lazarova Z, Bröcker EB, Yancey KB, Zillikens D. 1999. Antiepiligrin cicatricial pemphigoid: an underdiagnosed entity within the spectrum of scarring autoimmune subepidermal bullous diseases? *Arch Dermatol.* 135(9):1091–8.
61. Egan CA, Lazarova Z, Darling TN, Yee C, Coté T, Yancey KB. 2001. Antiepiligrin cicatricial pemphigoid and relative risk for cancer. *Lancet.* 357(9271):1850–1.
62. Goletz S, Probst C, Komorowski L, Schlumberger W, Fechner K, van Beek N, et al.

2019. A sensitive and specific assay for the serological diagnosis of antilaminin 332 mucous membrane pemphigoid. *Br J Dermatol.* 180(1):149–56.
63. Heppe EN, Tofern S, Schulze FS, Ishiko A, Shimizu A, Sina C, et al. 2017. Experimental laminin 332 mucous membrane pemphigoid critically involves C5aR1 and reflects clinical and immunopathological characteristics of the human disease. *J Invest Dermatol.* 137(8):1709–18.
64. Yeh SW, Usman AQ, Ahmed AR. 2004. Profile of autoantibody to basement membrane zone proteins in patients with mucous membrane pemphigoid: long-term follow up and influence of therapy. *Clin Immunol.* 112(3):268–72.
65. Carrozzo M, Cozzani E, Broccoletti R, Carbone M, Pentenero M, Arduino P, et al. 2004. Analysis of antigens targeted by circulating IgG and IgA antibodies in patients with mucous membrane pemphigoid predominantly affecting the oral cavity. *J Periodontol.* 75(10):1302–8.
66. Suresh L, Kumar V. 2007. Significance of IgG4 in the diagnosis of mucous membrane pemphigoid. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 104(3):359–62.
67. Kouros AS, Yancey KB. 2011. Pathogenesis of mucous membrane pemphigoid. *Dermatol Clin.* 29(3):479–84.
68. Domloge-Hultsch N, Gammon WR, Briggaman RA, Gil SG, Carter WG, Yancey KB. 1992. Epiligrin, the major human keratinocyte integrin ligand, is a target in both an acquired autoimmune and an inherited subepidermal blistering skin disease. *J Clin Invest.* 90(4):1628–33.
69. Schmidt E, Skrobek C, Kromminga A, Hashimoto T, Messer G, Bröcker EB, et al. 2001. Cicatricial pemphigoid: IgA and IgG autoantibodies target epitopes on both intra- and extracellular domains of bullous pemphigoid antigen 180. *Br J Dermatol.* 145(5):778–83.

70. Chan LS, Majmudar AA, Tran HH, Meier F, Schaumburg-Lever G, Chen M, et al. 1997. Laminin-6 and laminin-5 are recognized by autoantibodies in a subset of cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 108(6):848–53.
71. Bédane C, McMillan JR, Balding SD, Bernard P, Probst C, Bonnetblanc JM, et al. 1997. Bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid autoantibodies react with ultrastructurally separable epitopes on the BP180 ectodomain: Evidence that BP180 spans the lamina lucida. *J Invest Dermatol.* 108(6):901–7.
72. Balding SD, Prost C, Diaz LA, Bernard P, Bedane C, Aberdam D, et al. 1996. Cicatricial pemphigoid autoantibodies react with multiple sites on the BP180 extracellular domain. *J Invest Dermatol.* 106(1):141–6.
73. Amber KT, Bloom R, Hertl M. 2016. A systematic review with pooled analysis of clinical presentation and immunodiagnostic testing in mucous membrane pemphigoid: Association of anti-laminin-332 IgG with oropharyngeal involvement and the usefulness of ELISA. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 30(1):72–7.
74. Goletz S, Zillikens D, Schmidt E. 2017. Structural proteins of the dermal-epidermal junction targeted by autoantibodies in pemphigoid diseases. *Exp Dermatol.* 26(12):1154–62.
75. Van den Bergh F, Eliason S, Giudice G. 2011. Type XVII collagen (BP180) can function as a cell-matrix adhesion molecule via binding to laminin 332. *Matrix Biol.* 30(2):100–8.
76. Chen M, Marinkovich M, Jones J, O’Toole E, Li Y, Woodley D. 1999. NC1 domain of type VII collagen binds to the beta3 chain of laminin 5 via a unique subdomain within the fibronectin-like repeats. *J Invest Dermatol.* 112(2):177–83.
77. Nishiuchi R, Takagi J, Hayashi M, Ido H, Yagi Y, Sanzen N, et al. 2006. Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant alpha3beta1, alpha6beta1, alpha7beta1 and alpha6beta4 integrins. *Matrix Biol.* 25(3):189–97.

78. Carulli S, Beck K, Dayan G, Boulesteix S, Lortat-Jacob H, Rousselle P. 2012. Cell surface proteoglycans syndecan-1 and -4 bind overlapping but distinct sites in laminin $\alpha 3$ LG45 protein domain. *J Biol Chem.* 287(15):12204–16.
79. Hopkinson S, Findlay K, DeHart G, Jones J. 1998. Interaction of BP180 (type XVII collagen) and alpha6 integrin is necessary for stabilization of hemidesmosome structure. *J Invest Dermatol.* 111(6):1015–22.
80. Kazarov A, Yang X, Stipp C, Sehgal B, Hemler M. 2002. An extracellular site on tetraspanin CD151 determines alpha 3 and alpha 6 integrin-dependent cellular morphology. *J Cell Biol.* 158(7):1299–309.
81. Geerts D, Fontao L, Nievers M, Schaapveld R, Purkis P, GN W, et al. 1999. Binding of integrin alpha6beta4 to plectin prevents plectin association with F-actin but does not interfere with intermediate filament binding. *J Cell Biol.* 147(2):417–34.
82. Koster J, Geerts D, Favre B, Borradori L, Sonnenberg A. 2003. Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin alpha6beta4 important for hemidesmosome assembly. *J Cell Sci.* 116(Pt 2):387–99.
83. Koster J, van Wilpe S, Kuikman I, Litjens S, Sonnenberg A. 2004. Role of binding of plectin to the integrin beta4 subunit in the assembly of hemidesmosomes. *Mol Biol Cell.* 15(3):1211–23.
84. Rashid KA, Gürcan HM, Ahmed AR. 2006. Antigen specificity in subsets of mucous membrane pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 126(12):2631–6.
85. Neff AG, Turner M, Mutasim DF. 2008. Treatment strategies in mucous membrane pemphigoid. *Ther Clin Risk Manag.* 4(3):617–26.
86. Sárdy M, Kostaki D, Varga R, Peris K, Ruzicka T. 2013. Comparative study of direct and indirect immunofluorescence and of bullous pemphigoid 180 and 230 enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol.* 69(5):748–53.

87. van Beek N, Zillikens D, Schmidt E. 2018. Diagnosis of autoimmune bullous diseases. *J Dtsch Dermatol Ges.* 16(9):1077–91.
88. Schmidt E, Goebeler M, Hertl M, Sárdy M, Sitaru C, Eming R, et al. 2015. S2k guideline for the diagnosis of pemphigus vulgaris/foliaceus and bullous pemphigoid. *J Dtsch Dermatol Ges.* 13(7):713–27.
89. Gammon WR, Briggaman RA, Inman AO, Queen LL, Wheeler CE. 1984. 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.* 82(2):139–44.
90. Kippes W, Schmidt E, Roth A, Rzany B, Bröcker EB, Zillikens D. 1999. Immunopathological changes in 115 patients with bullous pemphigoid. *Hautarzt.* 50(12):866–72.
91. Ghohestani R, Kanitakis J, Nicolas JF, Cozzani E, Claudy A. 1996. Comparative sensitivity of indirect immunofluorescence to immunoblot assay for the detection of circulating antibodies to bullous pemphigoid antigens 1 and 2. *Br J Dermatol.* 135(1):74–9.
92. Schmidt E. 2016. Increasing the diagnostic sensitivity for mucous membrane pemphigoid by detection of salivary autoantibodies. *Br J Dermatol.* 174(5):956–7.
93. Setterfield JF, Shirlaw PJ, Kerr-Muir M, Neill S, Bhogal BS, Morgan P, et al. 1998. Mucous membrane pemphigoid: a dual circulating antibody response with IgG and IgA signifies a more severe and persistent disease. *Br J Dermatol.* 138(4):602–10.
94. Murakami H, Nishioka S, Setterfield JF, Bhogal BS, Black MM, Zillikens D, et al. 1998. Analysis of antigens targeted by circulating IgG and IgA autoantibodies in 50 patients with cicatricial pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 17(1):39–44.
95. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, et al. 2002. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a

- diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 30(3):224–32.
96. Sitaru C, Dährich C, Probst C, Komorowski L, Blöcker I, Schmidt E, et al. 2007. Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies. *Exp Dermatol.* 16(9):770–7.
 97. Tampoia M, Giavarina D, Di Giorgio C, Bizzaro N. 2012. Diagnostic accuracy of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) to detect anti-skin autoantibodies in autoimmune blistering skin diseases: A systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev.* 12(2):121–6.
 98. Yoshida M, Hamada T, Amagai M, Hashimoto K, Uehara R, Yamaguchi K, et al. 2006. Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 41(1):21–30.
 99. Hayakawa T, Furumura M, Fukano H, Li X, Ishii N, Hamada T, et al. 2014. Diagnosis of oral mucous membrane pemphigoid by means of combined serologic testing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 117(4):483–96.
 100. Marinkovich MP, Taylor TB, Keene DR, Burgeson RE, Zone JJ. 1996. LAD-1, the linear IgA bullous dermatosis autoantigen, is a novel 120-kDa anchoring filament protein synthesized by epidermal cells. *J Invest Dermatol.* 106(4):734–8.
 101. Kromminga A, Scheckenbach C, Georgi M, Hagel C, Arndt R, Christophers E, et al. 2000. Patients with bullous pemphigoid and linear IgA disease show a dual IgA and IgG autoimmune response to BP180. *J Autoimmun.* 15(3):293–300.
 102. Perriard J, Jaunin F, Favre B, Büdinger L, Hertl M, Saurat JH, et al. 1999. IgG autoantibodies from bullous pemphigoid (BP) patients bind antigenic sites on both the extracellular and the intracellular domains of the BP antigen 180. *J Invest Dermatol.* 112(2):141–7.

103. Yoshida M, Hamada T, Amagai M, Hashimoto K, Uehara R, Yamaguchi K, et al. 2006. Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 41(1):21–30.
104. Roussel A, Benichou J, Randriamanantany ZA, Gilbert D, Drenovska K, Houivet E, et al. 2011. Enzyme-linked immunosorbent assay for the combination of bullous pemphigoid antigens 1 and 2 in the diagnosis of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol.* 147(3):293–8.
105. Charneux J, Lorin J, Vitry F, Antonicelli F, Reguiat Z, Barbe C, et al. 2011. 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.* 147(3):286–91.
106. Schumann H, Baetge J, Tasanen K, Wojnarowska F, Schäcke H, Zillikens D, et al. 2000. The shed ectodomain of collagen XVII/BP180 is targeted by autoantibodies in different blistering skin diseases. *Am J Pathol.* 156(2):685–95.
107. Schmidt E, Kromminga A, Mimietz S, Leinfelder U, Sitaru C, Bröcker EB, et al. 2002. A highly sensitive and simple assay for the detection of circulating autoantibodies against full-length bullous pemphigoid antigen 180. *J Autoimmun.* 18(4):299–309.
108. Roh JY, Yee C, Lazarova Z, Hall RP, Yancey KB. 2000. The 120-kDa soluble ectodomain of type XVII collagen is recognized by autoantibodies in patients with pemphigoid and linear IgA dermatosis. *Br J Dermatol.* 143(1):104–11.
109. Nie Z, Hashimoto T. 1999. IgA antibodies of cicatricial pemphigoid sera specifically react with C-terminus of BP180. *J Invest Dermatol.* 112(2):254–5.
110. Mariotti F, Grosso F, Terracina M, Ruffelli M, Cordiali-Fei P, Sera F, et al. 2004. Development of a novel ELISA system for detection of anti-BP180 IgG and characterization of autoantibody profile in bullous pemphigoid patients. *Br J Dermatol.* 151(5):1004–10.

111. Izumi K, Nishie W, Mai Y, Wada M, Natsuga K, Ujiie H, et al. 2016. Autoantibody profile differentiates between inflammatory and noninflammatory bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 136(11):2201–10.
112. Izumi K, Nishie W, Mai Y, Ujiie H, Iwata H, Natsuga K, et al. 2017. Detection of mucous membrane pemphigoid autoantibodies by full-length BP180 enzyme-linked immunosorbent assay. *J Dermatol Sci.* 88(2):247–8.
113. Smith DB, Johnson KS. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 67(1):31–40.
114. Giudice GJ, Emery DJ, Zelickson BD, Anhalt GJ, Liu Z, Diaz LA. 1993. Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Dermatol Sci.* 6(1):38.
115. Tasanen K, Eble JA, Aumailley M, Schumann H, Baetge J, Tu H, et al. 2000. Collagen XVII is destabilized by a glycine substitution mutation in the cell adhesion domain Col15. *J Biol Chem.* 275(5):3093–9.
116. Di Zenzo G, Grosso F, Terracina M, Mariotti F, De Pità O, Owaribe K, et al. 2004. Characterization of the anti-BP180 autoantibody reactivity profile and epitope mapping in bullous pemphigoid patients. *J Invest Dermatol.* 122(1):103–10.
117. Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Fontao L, Calabresi V, Hofmann SC, Hellmark T, et al. 2008. Multicenter prospective study of the humoral autoimmune response in bullous pemphigoid. *Clin Immunol.* 128(3):415–26.
118. Holtsche M, Zillikens D, Schmidt E. 2018. Mucous membrane pemphigoid. *Hautarzt.* 69(1):67–83.

8. ANHÄNGE

8.1 Publikationen und Kongressbeiträge

Tegtmeyer J, Probst C, Komorowski L, Zillikens D, Schmidt E, Goletz S. 2019. Sera of patients with bullous pemphigoid and mucous membrane pemphigoid react with a C-terminal 246 amino acid stretch of BP180. *J Invest Dermatol.* 139(9):225.

S. Goletz, **J. Tegtmeyer**, C. M. Hammers, D. Zillikens, C. Probst, L. Komorowski, E. Schmidt. 2021. Sera of patients with bullous pemphigoid and mucous membrane pemphigoid react with C-terminal epitopes on BP180 by immunoblotting and ELISA. *IPPF Scientific Symposium, Pemphigus & Pemphigoid: Lost in Translation?* 19.-21.09.2021.

9. DANKSAGUNGEN

Ich danke meinem Doktorvater **Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. Enno Schmidt** für die Möglichkeit auf dem spannenden Gebiet der bullösen Autoimmundermatosen lernen und erfolgreich forschen zu können. Ich bin ihm für jedes fachlich-kritische und persönliche Gespräch und die motivierende Unterstützung äußerst dankbar.

Danke an **Prof. Dr. med. Detlef Zillikens**, Direktor der Klinik für Dermatologie, die im Autoimmunlabor der Klinik asservierten Seren nutzen zu dürfen sowie für die hilfreiche Diskussion.

Ich bedanke mich beim **Graduiertenkolleg 1727 *Modulation of Autoimmunity*** für die Unterstützung im Rahmen des Stipendiums und während der GRK Retreats.

Mein besonderer Dank geht an meine Betreuerin und Mentorin **Dr. rer. nat. Stephanie Goletz**. Während der gesamten Zeit stand sie mir stets hilfsbereit und fördernd zur Seite. Ich danke ihr für die geduldige Anleitung im Labor und den gemeinsamen Spaß.

Darüber hinaus danke ich **Vanessa Krull** und **Izabela Tomczak** für ihre praktische Hilfe, die Gespräche und die Unterstützung im Laboralltag.

Ich danke allen Mitarbeitern der Forschungslabore, insbesondere der **Abteilung Translation**, für ihre unerschütterliche Hilfsbereitschaft bei allen aufkommenden Fragen und die ausgezeichnete Zusammenarbeit im Labor. Es war mir eine große Freude.

Ich danke **Luise** für ihre stärkende und humorvolle Begleitung und unendliche Geduld.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern **Christine und Frieder**, sowie **Daniel, Laura, Jasper und Georg** für ihre anregenden Gespräche, die stete Aufmunterung und emotionale Unterstützung.

10. LEBENSLAUF

Persönliche Angaben

Jonathan Tegtmeyer
Geboren am 29. August 1994
in Lübeck



Schulische Ausbildung

2001-2005 Friedrich-Ebert-Schule, Baunatal
2005-2013 Friedrichsgymnasium, Kassel; Abschluss Abitur

Studium

10/ 2013- 09/ 2016 Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in
Göttingen
03/ 2016 Erstes Staatsexamen
10/ 2016-09/ 2021 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
09/ 2017-02/ 2018 Studium der Humanmedizin an der Universität Sorbonne Paris-
Nord
09/ 2018-05/ 2019 Stipendiat des Graduiertenkollegs 1727 *Modulation of
Autoimmunity*
04/ 2020 Zweites Staatsexamen
05/ 2020-04/ 2021 Praktisches Jahr
06/ 2021 Drittes Staatsexamen



Hamburg, 06. Oktober 2021

Unterschrift