

Aus der Medizinischen Kleintierklinik
Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. Katrin Hartmann

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Ralf Müller

**Das von humanen Nierenzellen produzierte canine NC16a-Protein soll als Substrat
für immunologische und serologische Diagnostik bei Hunden mit vermutetem
bullösen und Schleimhaut- Pemphigoid dienen.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Von
Nina Maria Fischer
aus Immenstadt im Allgäu

München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Referent: Univ.-Prof. Dr. Müller
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Kaspers

Tag der Promotion: 06. Februar 2009

**Meinen Eltern
in Dankbarkeit**

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>I. Einleitung</i>	<i>1</i>
<i>II. Literaturübersicht</i>	<i>3</i>
2.1 Bullöses und Schleimhaut-Pemphigoid.....	3
2.1.1 Inzidenz.....	3
2.1.2 Ätiologie.....	4
2.1.3 Klinik des bullösen Pemphigoids.....	4
2.1.4 Klinik des Schleimhaut-Pemphigoids.....	5
2.1.5 Immunpathogenese von BP/MMP.....	8
2.1.5.1 Aufbau der Basalmembranzzone.....	10
2.1.5.2 Hemidesmosom-Verankerungs-Komplex	10
2.1.5.2.1 BP230 und Plektin	11
2.1.5.2.2 Laminin-5.....	11
2.1.5.2.3 $\alpha_6\beta_4$ -Integrin	12
2.1.5.2.4 Kollagen XVII (BP180)	12
2.1.5.2.4.1 Aufbau	12
2.1.5.2.4.2 Bindungspartner	13
2.1.5.2.4.3 NC16a.....	14
2.1.5.2.4.3.1 Antigenität von NC16a in der Humanmedizin	14
2.1.5.2.4.3.2 Antigenität von NC16a in der Tiermedizin.....	16
2.1.6 Diagnostik	17
2.1.6.1 Anamnese und Klinik.....	17
2.1.6.2 Histopathologie.....	17
2.1.6.3 Immunhistochemische Verfahren.....	19
2.1.6.4 Immunerologische Untersuchung.....	21
2.1.7 Therapie.....	21
2.1.8 Prognose.....	24
<i>III. Material und Methoden</i>	<i>25</i>
3.1 Material	25
3.1.1 Einschlusskriterien der Hunde	25
3.1.1.1 Signalement der in unserer Studie mitwirkenden Hunde.....	25
3.1.2 Material.....	26
3.2 Methoden.....	27
3.2.1 Indirekter Immunfluoreszenztest an Salzpalthaut	27
3.2.1.1 Prinzip.....	27
3.2.1.2 Durchführung.....	27
3.2.2 Gewinnung der DNA zur Herstellung des NC16a-Fragments	28
3.2.2.1 RNA Extraktion.....	28
3.2.2.1.1 Durchführung	28
3.2.2.2 RNA Messung.....	29
3.2.2.3 Reverse Transkription in cDNA.....	29
3.2.2.4 PCR.....	30

3.2.2.4.1	Primerkonstruktion.....	31
3.2.2.4.2	PCR Durchführung.....	33
3.2.2.5	Agarosegelelektrophorese.....	33
3.2.2.5.1	Durchführung.....	34
3.2.2.6	DNA-Extraktion.....	34
3.2.3	Klonierung.....	34
3.2.3.1	Vektor:pcDNA3.1/V5-HIS-TOPO Plasmid.....	35
3.2.3.1.1	Transformation in E.coli.....	35
3.2.3.1.1.1	Durchführung.....	35
3.2.3.1.2	Anzucht der Bakterien.....	36
3.2.3.1.2.1	Auf Ampicillin Platten.....	36
3.2.3.1.2.2	In Lb- Flüssigmedium.....	36
3.2.3.1.3	PCR.....	36
3.2.3.1.4	Gelelektrophorese.....	37
3.2.3.1.5	Wiederholung PCR und Gelelektrophorese.....	37
3.2.3.1.6	Reinigung der DNA.....	37
3.2.3.1.7	Messung der DNA-Konzentration.....	37
3.2.3.1.8	Sequenzierung der DNA.....	37
3.2.3.2	Vektor: pND14-Plasmid.....	38
3.2.3.2.1	Subklonierung von NC16a.....	38
3.2.3.2.1.1	PCR.....	38
3.2.3.2.1.2	Gelelektrophorese.....	38
3.2.3.2.1.3	Extraktion aus Gel.....	39
3.2.3.2.1.4	Reinigung des Plasmids.....	39
3.2.3.2.1.5	Digestion der beiden Plasmide.....	39
3.2.3.2.1.6	Gelelektrophorese & Gel-Extraktion von pND14/DSG1.....	40
3.2.3.2.2	Ligation in pND14 Plasmid.....	40
3.2.3.2.3	Transformation in E.coli.....	41
3.2.3.2.4	Anzucht der Bakterien.....	41
3.2.3.2.4.1	Auf Ampicillin Platten.....	41
3.2.3.2.4.2	In Luria-Basis Flüssigmedium.....	41
3.2.3.2.5	PCR.....	41
3.2.3.2.6	Gelelektrophorese.....	42
3.2.3.2.7	Anzüchten zweier Klone in Lb-Medium.....	42
3.2.3.2.8	Reinigung der DNA.....	42
3.2.3.2.9	Messung der DNA-Konzentration.....	42
3.2.3.2.10	Wiederholung der Digestion und Gelelektrophorese.....	43
3.2.3.2.11	Sequenzierung.....	43
3.2.4	Transfektion.....	43
3.2.4.1	293T Zellen.....	44
3.2.4.1.1	293T Zellmedium.....	44
3.2.4.1.2	Auftauen & Anzüchten der Zellen.....	44
3.2.4.2	Aufbringen der Zellen auf Slides.....	44
3.2.4.3	Transfektion der Zellen.....	45
3.2.4.3.1	Durchführung.....	46
3.2.5	Indirekter Immunfluoreszenztest an transfizierten Zellen.....	46
IV.	Ergebnisse.....	47
4.1	Immunfluoreszenztest an Salzspalthaut.....	47
4.2	DNA-Gewinnung zur Herstellung des NC16a-Fragments.....	48
4.2.1	RNA Gewinnung und Konzentrationsbestimmung.....	48
4.2.2	PCR.....	48
4.3.1	Vektor: pcDNA 3.1/V5-HIS-TOPO Plasmid.....	49
4.3.2	Vektor: pND14-Plasmid.....	53

4.4	Transfektion	55
4.5	Indirekter Immunfluoreszenztest an transfizierten Zellen	56
V.	<i>Diskussion</i>	60
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	60
5.2	NC16a als Zielantigen von BP/MMP Autoantikörpern	60
5.3	Erörterung möglicher Fehler	61
5.3.1	Fehlen von Autoantikörpern.....	61
5.3.2	Fehlerhafte Methodik	61
5.3.3	Geringe Test-Sensitivität	62
5.3.4	Expression eines nicht relevanten Proteins.....	62
5.4	Schlußfolgerung.....	63
5.5	Ausblick in die Zukunft.....	64
VI	<i>Zusammenfassung</i>	65
VII	<i>Summary</i>	67
VIII	<i>Literaturverzeichnis</i>	69
IX	<i>Anhang</i>	77
9.1	Material	77
9.1.1	Verbrauchsmaterial	77
9.1.2	Geräte.....	77
9.1.3	Gebrauchsfertige Testkits	78
9.1.4	Chemikalien.....	78
9.1.5	Zellen.....	79
9.1.6	Bakterien.....	79
9.1.7	Plasmide.....	79
9.1.8	Media.....	79
9.1.9	Rezepte	80
9.1.10	Antikörper für Immunfluoreszenztest	81
9.2	Tabellenverzeichnis	82
9.3	Abbildungsverzeichnis	83
9.4	Tierärzfragebogen.....	86
9.5	Tabelle 6: Prozentuale Antikörperbindung an BP180	89
	<i>Lebenslauf</i>	90
	<i>Danksagung</i>	93

Abkürzungsverzeichnis

A _{260nm}	Absorption des Lichts bei der Wellenlänge 260 nm
A _{280nm}	Absorption des Lichts bei der Wellenlänge 280 nm
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AISBD	Autoimmun subepidermal blasenbildende Hautkrankheit (engl. autoimmun subepidermal blistering disease)
Amp-r	Ampicillin Resistenzgen (β -lactamase)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
bidest.	Bidestillata
BP	Bullöses Pemphigoid
bp	Basenpaar (engl. base pair)
BPAG1	Bullöses Pemphigoid Antigen 1
BPAG2	Bullöses Pemphigoid Antigen 2
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa (ungefähr)
CA	Californien
CMVIE	Cytomegalovirus immediate early enhancer/promoter/intron A
cDNA	Komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
CTE	Constitutives Retrovirus Transportelement
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIF	Direkter Immunfluoreszenztest
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dr	Doktor
EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
ECD	Extrazelluläres Department
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
FBS	Fetales Kälberserum (engl. Fetal Bovine Serum)
FL	Florida
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
h	Stunde (engl. hour)
HG	Herpes gestitationes = Pemphigus gestitationes
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HIS	Polyhistidine tag
ICD	Intrazelluläres Department
IgG	Immunglobulin G
IIF	Indirekter Immunfluoreszenztest
IL	Interleukin
IN	Indiana
Kb	Kilo-Basenpaar (1000 Basenpaare)
Lb	Luria Base
Lsg.	Lösung
M	Molar
m	Männlich
MA	Massachusetts
MCS	Multiple Klonierungsstelle (engl. multiple cloning site)
MD	Maryland
ME	Maine
min	Minuten
mk	Männlich kastriert
ml	Milliliter
MMP	Schleimhaut-Pemphigoid (engl. Mucous membrane pemphigoid)
MN	Minnesota
MO	Missouri
mRNA	Boten-RNA (engl. Messenger RNA)

n	Anzahl (engl. number)
nm	Nano Meter
NaCl	Natriumchlorid
NC	North Carolina
NCSU	North Carolina State University
NJ	New Jersey
NY	New York
OH	Ohio
PA	Pennsylvania
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
po.	Per os (oral)
Poly A	Bovine Wachstumshormon Poly-A Domäne
PU/PD	Polyurie/Polydipsie
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
sec	Sekunden
SOC	Super optimales Medium mit Katabolit-Hemmung (engl. Super Optimal broth with Catabolite repression)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TM	Transmembraner Teil
TPA	Gewebsplasminogen Aktivator (engl. tissue plasminogen activator)
UV	ultraviolett
V5	V5-Protein
VA	Virginia
vgl.	Vergleiche
w	Weiblich
WI	Wisconsin
wk	Weiblich kastriert

I. Einleitung

Es existiert eine Vielzahl von autoimmunen Hauterkrankungen. Vielen ist gemeinsam, dass Autoantikörper gegen spezielle Strukturen in der Epidermis oder der dermoepidermalen Grenzzone gebildet werden, was zu einer Spaltung innerhalb der Epidermis oder zur Trennung von Epidermis und Dermis führt. Diese Trennung endet letztlich in der Bildung von Blasen, was zu der Bezeichnung „**autoimmun blasenbildende Hautkrankheiten**“ geführt hat.

Innerhalb dieser Gruppe kann je nach Lokalisation der Bläschen oder Pusteln noch weiter unterschieden werden (Hertl, Schuler 2002a). Intraepidermale Blasenbildung und Blasenbildung innerhalb der Wurzelscheide von Haarfollikeln kann man bei Erkrankungen des Pemphigus-Komplexes beobachten. Bei subepidermal in der *Lamina lucida* der Basalmembranzone gelegenen Blasen spricht man von der Gruppe der **autoimmun subepidermal blasenbildenden Hautkrankheiten** („autoimmune subepidermal blistering diseases“, AISBD). Bei letztgenannter Gruppe handelt es sich um chronische Hauterkrankungen, welche bei Menschen, Hunden, Katzen, Schweinen und Pferden auftreten. Zu ihr zählen unter anderem die Krankheiten Epidermolysis bullosa acquisita und die IgA-lineare Dermatose. Die zwei wichtigsten Vertreter dieser Gruppe und das Thema dieser Übersicht sind jedoch das bullöse Pemphigoid (BP) und das Schleimhautpemphigoid („mucous membrane pemphigoid“, MMP).

Die Inzidenz von BP und MMP ist gering, dennoch werden diese Krankheiten im Bereich der Tiermedizin aufgrund der ansteigenden Qualität der Diagnostik und vermehrten Untersuchung von histopathologischen Proben zunehmend häufiger festgestellt.

Aufgrund der aggressiven Therapie mit immunsuppressiven Medikamenten, meist Glukokortikoiden, leiden die Patienten häufig an erheblichen Nebenwirkungen. Somit kommt einer guten Diagnostik, der richtigen Diagnosestellung und der dazu passenden Therapie eine große Bedeutung zu.

Das meist praktizierte Testverfahren stellt hierbei die Histopathologie dar, aber auch der Nachweis der Autoantikörper wird zunehmend zur Bestätigung einer AISBD herangezogen. Immunserologische Untersuchungen wie ELISA und Immunoblot-Untersuchungen spielen bisher in der Tiermedizin eine geringere Rolle, dagegen wird die

Immunhistochemie bereits erfolgreich eingesetzt. Hierbei weist der direkte Immunfluoreszenztest (DIF) gewebegebundene Antikörper nach, im Gegensatz zum indirekten Immunfluoreszenztest (IIF), bei dem Autoantikörper im Serum des Patienten entdeckt werden können. Ein Nachteil dieser beiden Testverfahren ist allerdings, dass ein Vorhandensein von Autoantikörpern damit zwar nachgewiesen werden kann, eine genaue Bestimmung des Proteins, welches von den Autoantikörpern angegriffen wird, aber nicht möglich ist. Der IIF, praktiziert an normaler caniner Salz-Spalthaut, ermöglicht durchaus eine Unterscheidung zwischen epidermaler (Bindung am Blasendach) und dermaler (Bindung am Blasenboden) Bindung der Autoantikörper, dennoch kann die genaue individuelle Antigenstruktur nicht ermittelt werden.

ELISA- und Immunoblot-Studien der Humanmedizin, die in der Literaturübersicht noch eingehender besprochen werden, zeigten, dass im Falle von BP und MMP vor allem das Kollagen XVII und speziell die extrazellulär gelegene NC16a Region von Autoantikörpern angegriffen wird. Xu et al. (Xu, O'Toole et al. 2000) bewiesen durch Immunoblot-Studien, dass auch bei caninen Patienten NC16a das größte antigene Potential zu besitzen scheint.

Ziel dieser Arbeit war es ein neues Testverfahren zum Nachweis von BP und MMP beim Hund zu kreieren. Dabei sollten humane embryonale Nierenzellen mit dem caninen NC16a transfiziert werden. Diese Zellen sollten als Substrat für immunhistochemische und immunerologische Untersuchungen dienen. Durch die ausschließliche Expression des NC16a-Proteins sollte ein sehr spezifischer Test zum Nachweis von BP- und MMP-Erkrankungen geschaffen werden. Im Gegensatz zum IIF an caniner Salzspalthaut, bei dem zwar das Vorhandensein von Autoantikörpern bewiesen werden, deren Zielantigenstruktur jedoch nicht ermittelt werden kann, weist ein IIF an diesen transfizierten Zellen nur Antikörper nach, welche spezifisch gegen NC16a gerichtet sind.

II. Literaturübersicht

2.1 Bullöses und Schleimhaut-Pemphigoid

Das Bullöse Pemphigoid (BP) wurde erstmals im Jahre 1953 von Lever als eine chronische autoimmune Hauterkrankung, die hauptsächlich bei älteren Menschen auftritt, beschrieben (Lever W. F. 1953). 1995 wies Iwasaki et al. als erster Autoantikörper gegen das BP180-Protein bei einem Hund nach, der klinisch Blasenbildung der Haut zeigte, und bewies somit, dass ein canines Äquivalent zum humanen bullösen Pemphigoid existiert (Iwasaki, Olivry et al. 1995). Vier Jahre später gelang es Olivry et al. diese Krankheit bei Katzen nachzuweisen (Olivry, Chan et al. 1999). Das Schleimhaut Pemphigoid kann als die entsprechende Krankheit der Schleimhäute angesehen werden (Favrot, Dunston et al. 2003) und wurde 2001 im Bereich der Tiermedizin als eine eigenständige Krankheit anerkannt (Olivry, Dunston et al. 2001).

2.1.1 Inzidenz

Das Vorkommen dieser zwei Krankheiten wird sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin relativ gering eingeschätzt. Allerdings wird die Diagnose in der Tiermedizin in den letzten Jahren durch die gestiegene Qualität der Diagnostik und vermehrte Untersuchung von histopathologischen Proben zunehmend häufiger gestellt.

Das Schleimhaut-Pemphigoid kommt in der Humanmedizin sehr selten vor. Obwohl es nach dem bullösen Pemphigoid die zweithäufigste Erkrankung unter den autoimmunen subepidermal blasenbildenden Hauterkrankungen ist, schätzt man das Auftreten auf eine erkrankte Person pro eine Million Personen pro Jahr. Das bullöse Pemphigoid dagegen tritt bei durchschnittlich sieben Personen pro eine Million Personen pro Jahr auf, wobei das Risiko zu erkranken ab einem Alter von 60 Jahren stark ansteigt (Bernard, Vaillant et al. 1995, Jung, Kippes et al. 1999). Männer erkranken fast doppelt so häufig wie Frauen, eine Rassen- oder geographische Prädisposition wurde nicht beobachtet (Jung, Kippes et al. 1999).

Im Gegensatz zum Menschen sieht man bei Hunden das Krankheitsbild des Schleimhaut-Pemphigoids häufiger. Bei ca. 53% aller beim Hund diagnostizierten autoimmunen subepidermal blasenbildenden Hauterkrankungen handelt es sich um das Schleimhaut-

Pemphigoid und nur bei ca 12% kann ein bullöses Pemphigoid diagnostiziert werden (Olivry 2008). Im Moment kann über die Prävalenz und Inzidenz von BP und MMP bei Hunden keine spezifische Angabe gemacht werden. Es wurden zu wenige Fälle von caninen BP veröffentlicht, um eine aussagekräftige, epidemiologische Analyse zu gestatten. Zwar wurden im Laufe der Jahre einige Fallberichte von BP (Turnwald, Ochoa et al. 1981, White, Rosser et al. 1984, Scott, Manning et al. 1982, Fadok, Janney 1982, Dunn 1995) und eine kleine Studie mit acht an BP erkrankten Hunden (Scott, Walton et al. 1987) veröffentlicht. Bei keinem dieser Krankheitsfälle wurde allerdings das Autoantigen identifiziert, und bei kritischer Analyse könnte es sich durchaus bei einigen der Fälle auch um eine andere autoimmun blasenbildende Krankheit, wie MMP oder EBA, gehandelt haben. Der Mangel an veröffentlichten bewiesenen Studien zeigt, dass es sich bei caninem BP und auch bei MMP um eine äußerst seltene Krankheit handelt (Olivry 2008). Beim Hund kann keine Alters- oder Geschlechtsprädisposition ermittelt werden, es wurde jedoch von einer Rassenprädisposition von Collie, Dobermann Pinscher (Scott, Miller et al. 2001) und Dachshund (Gross, Ihrke et al. 2005) berichtet.

2.1.2 Ätiologie

Es gibt mehrere Faktoren, die als Auslöser dieser Krankheiten diskutiert werden. Die meisten Fälle treten spontan auf. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass Medikamente wie beispielsweise Penicillin, Furosemid und Diazepam, und UV-Licht das Potential besitzen diese Krankheit auszulösen. Es existiert außerdem eine paraneoplastische Form des bullösen Pemphigoids (Lawrence Chan 2007).

2.1.3 Klinik des bullösen Pemphigoids

Die klinischen Anzeichen dieser Krankheit können stark variieren. In der Humanmedizin findet man erbsengroße, teilweise hämorrhagische Blasen auf der äußeren Haut, die später zu Erosionen und Narbenbildung führen können. Es gibt allerdings auch Berichte von Personen, bei denen lediglich leichte Erytheme, Urtikaria oder Prurigo simplex subacuta festgestellt wurden. Ein häufiges präklinisches- bzw. Begleitsymptom von bullösem Pemphigoid ist Juckreiz (Lawrence Chan 2007). Die Prädispositionsstellen dieser

Krankheit sind beim Menschen der Unterbauch und die Innenseite von Schenkeln und Armen.

Beim Hund sind die klinischen Zeichen dieser Krankheit weitgehend identisch. Die Läsionen treten hauptsächlich im axillären und inguinalen Bereich auf, es wurde auch von befallenen Pfoten berichtet. Im Gegensatz zum Menschen zeigen die Blasen beim Hund allerdings deutlich weniger Beständigkeit. Sie rupturieren sehr leicht und führen zu Ulzerationen und Krustenbildung (Abb. 1), was nicht selten zu Sekundärinfektionen und starkem Juckreiz führen kann. Natürlich sollte bei Auftreten von ulzerativen Hautläsionen nicht vorschnell die Diagnose einer subepidermal blasenbildenden Hauterkrankung gestellt werden. Die Hauptdifferentialdiagnosen für BP sind bakterielle oder Pilzinfektionen, Pemphigus vulgaris, systemischer Lupus erythematosus, Erythema multiforme, Medikamentenunverträglichkeiten, Vaskulitis und kutanes epitheliotropes Lymphom (Medleau und Hnilica 2006).

2.1.4 Klinik des Schleimhaut-Pemphigoids

Wie bereits erwähnt, befällt das Schleimhaut-Pemphigoid vornehmlich die Mukosa und mukokutanen Übergänge und führt dort zu Blasenbildung, Erosionen und Ulzerationen. Weiterhin können auch Läsionen in der mukösen Membran des Auges auftreten und eine chronische Konjunktivitis, eine Fibrose und im späteren Stadium ein Symblepharon, Entropium oder Trichiasis verursachen. All dies kann zu Vernarbungen und schließlich sogar zur Erblindung des Patienten führen (Scully, Carrozzo et al. 1999). Selten werden Läsionen im Bereich des Larynx, des Ösophagus, der Nase, des Ohres oder im analen und vulvaren Bereich und der Haut beschrieben (Scully, Carrozzo et al. 1999).

Auch bei dieser Erkrankung sind die Symptome, die beim Hund auftreten, fast identisch mit den beim Menschen beschriebenen. Allerdings entwickelt der Hund häufiger Läsionen im Bereich der Lippen (vgl. Abb. 3), des Planum nasale (vgl. Abb. 2), der Augen (vgl. Abb. 5) und an der Innen- und Außenseite der Ohren (vgl. Abb. 4). Außerdem wird bei Hunden häufig eine Depigmentation der befallenen Stellen gesehen (Olivry 2008). Auch hier muß differentialdiagnostisch an die bei BP genannten Erkrankungen gedacht werden.



Abbildung 1: Canines BP. Blasen- und Krustenbildung im konkaven Teil des Ohres (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).



Abbildung 2: Canines MMP. Ulzera, Krusten und Depigmentation im Bereich der Nase (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).



Abbildung 3: Canines MMP. Blasenbildung im Bereich des mukokutanen Übergangs der äußeren Lippe (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).



Abbildung 4: Canines MMP. Ulzera und Krustenbildung an der Innenseite des Ohres (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).



Abbildung 5: Canines MMP. Ulzeration und Entzündung der Konjunktivalschleimhaut (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).

2.1.5 Immunpathogenese von BP/MMP

Bei allen AISBD treten Autoantikörper auf, welche gegen bestimmte Strukturproteine der Basalmembranzzone gerichtet sind. Tabelle 1 soll einen Überblick über die einzelnen Strukturen und die dazugehörigen Krankheiten liefern.

PROTEIN	AUTOIMMUN ERKRANKUNG	ERBKRANKHEIT
Keratin 5/14		Epidermolysis bullosa simplex
Plektin	Paraneoplastischer Pemphigus, Anti-Plectin-Pemphigoid	Epidermolysis bullosa simplex
BP180	Bullöses Pemphigoid, Schleimhaut-Pemphigoid, Pemphigus gestitationes, Lineare IgA Dermatose	Junktionale Epidermolysis bullosa (non-Herlitz Typ)
Laminin-5	Schleimhaut-Pemphigoid	Junktionale Epidermolysis (Herlitz- und non Herlitz-Typ)
$\alpha 6/\beta 4$-Integrin	Schleimhaut-Pemphigoid	Junktionale Epidermolysis mit Pylorusatresie
Kollagen VII	Epidermolysis bullosa aquisita	Dystrophische Epidermolysis bullosa

Tabelle 1: Strukturen der Basalmembran, welche in humanen hereditären und erworbenen bullösen Dermatosen eine Rolle spielen (Hertl, Schuler 2002b).

Im Falle von BP und MMP sind diese Antikörper gegen das 180-kd große Kollagen XVII (BP180) und/oder das 230-kd große Plakin-Protein (BP230) gerichtet (vgl. Abb. 6). Außerdem sind das Glykoprotein Laminin-5 und das $\alpha 6\beta 4$ -Integrin beim vernarbenden Schleimhaut-Pemphigoid involvierte Antigene (Hertl, Schuler 2002b)(vgl. Abb. 6). Die Bindung dieser Antikörper an die erwähnten Strukturen führt zu einer Aktivierung des Komplementsystems und zur Sekretion von Zytokinen – vor allem IL-6 und IL-8 - aus Keratinozyten (Schmidt, Reimer et al. 2000), welche chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und Monozyten wirken und somit die

Einwanderung und Aktivierung von diesen Entzündungszellen auslösen (Hertl, Schuler 2002b). Durch die Freisetzung von Proteasen kommt es zur Abspaltung des extrazellulären Anteils von BP180 und zum Zerreißen des Hemidesmosom-Komplexes und somit zu einer Trennung von Epidermis und Dermis. Diese subepidermale Spaltbildung führt zu der für die Krankheiten charakteristischen Blasenbildung.

Um die Pathogenese von BP/MMP zu verdeutlichen soll zunächst ein Überblick über die Strukturproteine der Basalmembranzzone folgen:

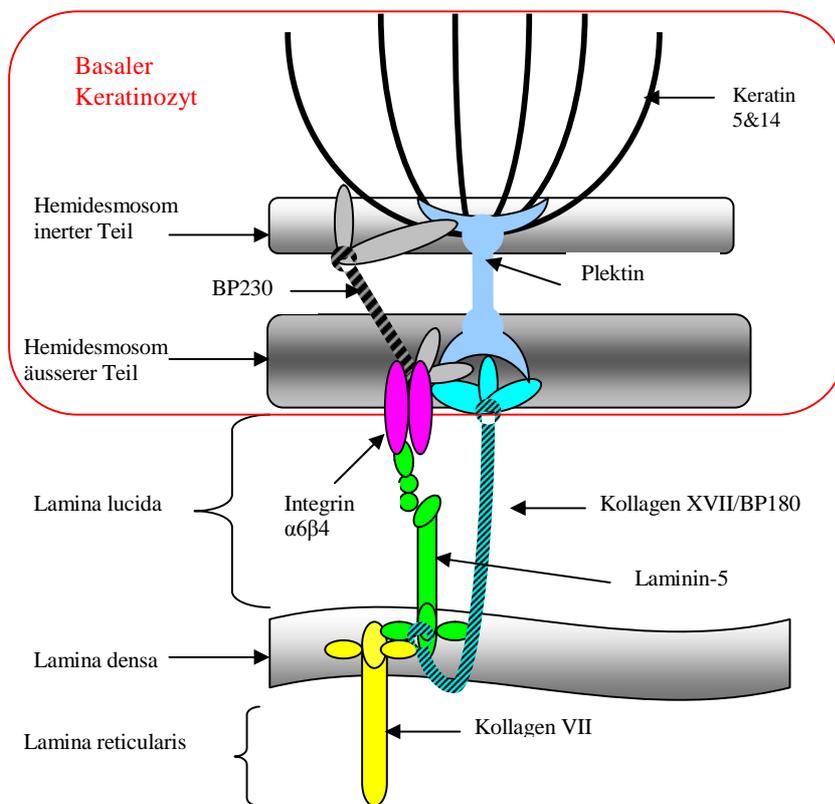


Abbildung 6: Darstellung der wichtigsten Proteine des Hemidesmosom-Verankerungskomplexes (modifiziert nach Olivry, 2006) (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).

2.1.5.1 Aufbau der Basalmembranzone

Die Haut besteht aus der Epidermis, der Dermis und der Subkutis. Epidermis und Dermis sind durch die 20-200 nm dicke Basalmembran getrennt, die lichtmikroskopisch aus zwei Teilen besteht, der *Lamina basale* und der *Lamina reticularis*. Betrachtet man die *Lamina basale* unter einem Elektronen-Mikroskop, so kann man zwischen einer hell erscheinenden *Lamina lucida* und einer sich dunkel darstellenden *Lamina densa* unterscheiden. Die wichtigsten Bestandteile dieser beiden Lamina sind die Glykoproteine Laminin-5 und Nidogen sowie Kollagen IV. Diese Bestandteile sichern die Festigkeit und Flexibilität der Basalmembran und führen somit zu einer gewissen Stabilität. Die *Lamina reticularis*, deren Dicke stark variieren kann, besteht aus Bindegewebe und einem Netz aus Kollagenfasern.

2.1.5.2 Hemidesmosom-Verankerungs-Komplex

Bei den Hemidesmosomen handelt es sich um komplexe molekulare Verbindungen die sich an der basalen Seite der Keratinozyten befinden. Sie sichern die Verbindung zwischen den Zellen der Epidermis und der Basalmembran. Hemidesmosomale Verbindungen treten in der Haut, der Kornea, in Teilen des Gastrointestinal- und Respirationstraktes und im Amnion auf.

Ultrastrukturell erscheinen die Hemidesmosomen als elektronendichte Bereiche der Basalmembran an der ventralen Seite der basalen Keratinozyten. Wie man in Abb. 6 erkennen kann, besteht ein Hemidesmosom aus einer inneren und äußeren Platte. An die innere Platte ziehen Bündel von Intermediärfilamenten, die aus Keratin 5 und 14 bestehen. Die innere Platte assoziiert mit der äußeren Platte in der *Lamina lucida*, und sogenannte Ankerfilamente stellen die Verbindung zur *Lamina densa* sicher. Über gekreuzte Ankerfibrillen (Kollagen IV) wird die *Lamina densa* schließlich an der untenliegenden Dermis befestigt. All die hier genannten Strukturen bilden zusammen den sogenannten Hemidesmosom-Verankerungskomplex (Borradori, Sonnenberg 1999). Im Folgenden sollen die Proteine dieses Komplexes einzeln besprochen werden.

2.1.5.2.1 BP230 und Plektin

Der innere Teil des Hemidesmosoms beinhaltet zwei Proteine der Plakin Familie: BP230 (BPAG1) und Plektin. Die Aufgabe dieser zytoplasmatischen Proteine ist es, das Hemidesmosom mit den Intermediärfilamenten (Keratin 5 & 14) zu verbinden. Beide Proteine besitzen eine zentrale spiralisch verdrehte Domäne, welche von zwei kugelförmigen Domänen flankiert wird (Borradori, Sonnenberg 1999).

BP230 bindet über sein COOH-Ende an die Intermediärfilamente (Yang, Dowling et al. 1996) und über das NH₂-Ende an die transmembranen Proteine BP180 und Integrin-β₄.

Das COOH-Ende des ca. 500 kDA schweren Plektins bindet an Keratine, Neurofilamente und Vimentin. Außerdem enthält das NH₂-Ende des Plektins Sequenzen, die mit dem zytoplasmatischem Schwanz des Integrin-β₄ interagieren (Niessen, Hulsman et al. 1997).

Somit dienen diese beiden zytoplasmatischen Proteine als Verbindung des Zytoskelets an der zytoplasmatischen Oberfläche.

2.1.5.2.2 Laminin-5

Wie bereits oben erwähnt, besteht die Basalmembran, genauer die *Lamina lucida* und *densa*, aus einem Gerüst aus verschiedenen Laminin-Typen und Kollagen IV. Dieses wird durch diverse Matrix-Moleküle wie Nidogen, Perlecan und Fibulin durch Brückenbildung gefestigt (Burgeson, Christiano 1997).

In Hemidesmosomen findet man vornehmlich Laminin-5. Dieses besteht aus drei verschiedenen Ketten, einer α₃, einer β₃ und einer γ₂ Kette. Auf der α₃-Kette ist eine G-Domäne zu finden, über welche Laminin-5 an α₆β₄-Integrin bindet. Über die β₃ und γ₂ Kette bindet es an die NC1 Region des Kollagen VII (Ankerfibrillen), außerdem bindet es an BP180 (Burgeson, Christiano 1997).

Somit stellt Laminin-5 eine wichtige Verbindung zwischen den Transmembran-Molekülen (Integrin und Bp180) und den Komponenten der dermalen Matrix (Kollagen VII) her.

2.1.5.2.3 $\alpha_6\beta_4$ -Integrin

Bei der Integrin-Familie handelt es sich um heterodimerische Transmembranmoleküle, die sich aus zwei assoziierten Ketten α_6 und β_4 zusammensetzen. Dabei ist vor allem das zytoplasmatische Ende von β_4 -Integrin bei der Verbindung von verschiedenen Proteinen des Hemidesmosom-Komplexes von Bedeutung. Dieses Ende setzt sich aus 1000 Aminosäuren zusammen und enthält zwei Paare von Typ III Fibronectin Segmenten, welche durch ein Verbindungssegment getrennt sind. Der membrannahe Teil des β_4 -Endes assoziiert mit Plektin und BP230, das distale COOH-Teil bindet an BP180 (Borradori, Sonnenberg 1999). $\alpha_6\beta_4$ -Integrin stellt einen Rezeptor für viele Laminin-Typen dar, in Hemidesmosomen bindet es vor allem das Laminin-5 (Carter, Ryan et al. 1991). Somit sind $\alpha_6\beta_4$ -Integrine Adhäsionsmoleküle, die die Zellen mit der extrazellulären Matrix verbinden und dadurch das Zytoskelett bilden. Zusätzlich sind Integrine äußerst wichtig für die Steuerung der Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Migration von Zellen (Borradori, Sonnenberg 1999).

Ein weiterer Vertreter der Transmembrankomponenten ist Kollagen XVII (BP180). Da dieses Protein im Fokus dieser Arbeit steht, soll es nun genauer besprochen werden.

2.1.5.2.4 Kollagen XVII (BP180)

Kollagen XVII ist ein membranfixiertes, epitheliales Protein der Haut und Schleimhäute und ist hauptsächlich in den basalen Keratinozyten zu finden. Es gehört zu der Familie der transmembranen Kollagene, das heißt es durchdringt die Zellmembran und reicht bis in die *Lamina lucida* der Basalmembran. Diese transmembranen Kollagene sind weit verbreitet und kommen hauptsächlich als Zelloberflächenrezeptoren oder Matrix-Komponenten vor (Franzke, Bruckner et al. 2005); des weiteren zählen sie zu den nicht fibrillären Kollagenen, welche von nichtkollagenen Teilen durchzogen sind, die die Flexibilität des Proteins erhöhen.

2.1.5.2.4.1 Aufbau

Kollagen XVII ist ein Homotrimer, das aus drei 180-kDA schweren alpha-1 Ketten besteht. Jede dieser Ketten (BP180) setzt sich aus einem 466 Aminosäuren langen

intrazellulärem N-terminalen Teil, einem kurzen (aus 23 Aminosäuren bestehend) transmembranen hydrophoben Teil und einem extrazellulärem, aus 1008 Aminosäuren bestehendem, C-terminalen Teil zusammen. Letzterer setzt sich aus 15 kollagenen Subdomänen (COL1 – COL15) zusammen, die durch die für Kollagene typische sich wiederholende GXY – Sequenz (G steht für Glycin, XY für zwei weitere Aminosäuren) gekennzeichnet sind und von 16 kurzen, nichtkollagenen Sequenzen (NC1 bis NC16a), unterbrochen werden (Borradori, Sonnenberg 1999) (siehe Abb. 7).

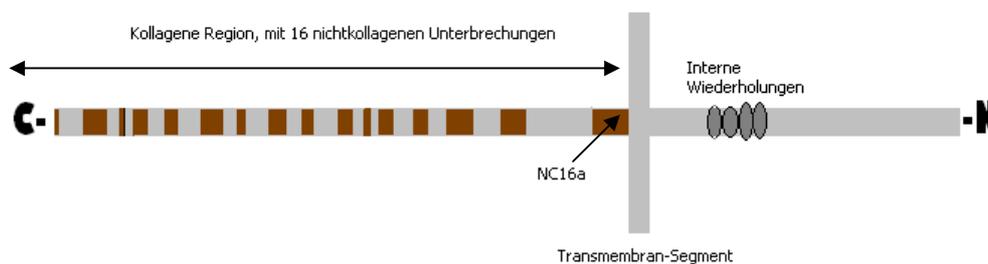


Abbildung 7: Darstellung des Kollagen XVII. Es besteht aus einem NH₂- terminalen intrazellulären Teil, einem transmembranen Teil und einem COOH-terminalen extrazellulärem Teil (modifiziert nach Borradori (Borradori, Sonnenberg 1999)).

2.1.5.2.4.2 Bindungspartner

Wie bereits oben kurz angedeutet, bindet BP180 im äußeren Teil des Hemidesmosoms an BP230, β_4 -Integrin sowie an Plektin. Hier sind Sequenzen im NH₂-terminalen Teil des zytoplasmatischen BP180-Endes für die Bindung an β_4 -Integrin verantwortlich (Borradori, Koch et al. 1997). Die NC16a-Region soll dagegen mit der α_6 -Integrin Domäne interagieren (Hopkinson, Baker et al. 1995) und BP180 bindet außerdem an die β_3 -Kette des Laminin-5 (Franzke, Bruckner et al. 2005).

2.1.5.2.4.3 NC16a

Das letzte der 16 nichtkollagenen Segmente des extrazellulären Teils von Bp180 wird NC16a-Region genannt. NC16a befindet sich direkt C-terminal der Transmembran-Region und besteht aus 77 Aminosäuren. Innerhalb der NC16a-Region soll vor allem eine 45 Aminosäuren lange Region die Zielstruktur für BP- und MMP-Autoantikörper darstellen.

2.1.5.2.4.3.1 Antigenität von NC16a in der Humanmedizin

Beim Menschen erkennt die Mehrzahl der BP/MMP-Autoantikörper Epitope, welche in der NC16a-Region des BP180 lokalisiert sind.

Die Analyse der aktuellsten Studien (Giudice, Emery et al. 1993, Giudice, Wilske et al. 1994, Matsumura, Amagai et al. 1996, Zillikens, Mascaro et al. 1997, Zillikens, Rose et al. 1997, Bedane, McMillan et al. 1997, Haase, Budinger et al. 1998, Nakatani, Muramatsu et al. 1998, Perriard, Jaunin et al. 1999, Egan, Taylor et al. 1999, Egan, Reddy et al. 2001, Lin, Fu et al. 2000b, Laffitte, Skaria et al. 2001, Amo, Ohkawa et al. 2001, Hofmann, Thoma-Uszynski et al. 2002, Kromminga, Sitaru et al. 2002, Kobayashi, Amagai et al. 2002, Sitaru, Schmidt et al. 2002, Dimson, Giudice et al. 2003, Di Zenzo, Grosso et al. 2004, Chan, Sun et al. 2003, Mariotti, Grosso et al. 2004, Hacker-Foegen, Zillikens et al. 2004, Sakuma-Oyama, Powell et al. 2004, Espana, del Olmo et al. 2005, Fairley, Fu et al. 2005, Shinojima, Ochiai et al. 2005, Calabresi, Carrozzo et al. 2007, Korn 2006, Martinez-De Pablo, Gonzalez-Ensenat et al. 2007, Sitaru, Dahnrich et al. 2007, Lin, Fu et al. 2000a, Liu, Diaz 2001, Chimanovitch, Schmidt et al. 1999, Feng, Wu et al. 2008), welche sich mit diesem Thema beschäftigten, zeigte, dass NC16a das Epitop mit der größten Antigenität und Pathogenität darstellt. Demnach besitzen über 80% aller BP- (Durchschnitt: 82,52%) und Pemphigus gestitationes- (Durchschnitt: 90,4%) Patienten zirkulierende Autoantikörper gegen das NC16a-Epitop. Dies wurde in ELISA und Immunoblot-Studien nachgewiesen. Tabelle (Anhang: Punkt 9.5) gibt die Studien und die darin ermittelten prozentualen Bindungsraten an verschiedene Epitope des BP180 wieder. 1997 wiesen Zillikens et al. (Zillikens, Mascaro et al. 1997) die Pathogenität von anti- BP180 Antikörpern in einem passiven Transfer-Maus-Modell nach. Außerdem entdeckten sie drei neue antigene Stellen, welche zusammen mit dem bereits

veröffentlichen MCW-1 Epitop in der NC16a-Region liegen. Sie bewiesen eine 100% ige Bindung aller getesteten BP -Seren an ein rekombinant produziertes Protein, das dieses BP180-Segment beinhaltet (Zillikens, Rose et al. 1997).

2001 kreierten Liu und Diaz (Liu, Diaz 2001) einen neuen ELISA. Das zu detektierende Antigen dieses Tests stellte ein rekombinant produziertes NC16a dar, welches ebenfalls die vier oben erwähnten antigenen Epitope enthielt. 94% der getesteten BP Seren reagierten in diesem Test positiv. Fairly et al. (Fairley, Fu et al. 2005) und Calabresi et al. (Calabresi, Carrozzo et al. 2007) berichteten, dass 90 % aller BP-Seren IgG Antikörper gegen NC16a besitzen.

Eine der neusten Studien von Sitaru et al. (Sitaru, Dahnrich et al. 2007) zeigte eine positive Reaktion bei 89, 8 % der getesteten Seren, in einem neu entwickeltem ELISA-Testsystem, welches vier mal hintereinander das NC16a-Epitop enthält.

Die Auswertung der oben erwähnten Studien zeigte aber auch, dass andere Epitope von Autoantikörpern entdeckt und gebunden werden. Diese befinden sich hauptsächlich auf der extrazellulären Domäne von BP180 (Abb. 8). Die durchschnittliche Bindungsrate an diese Epitope ist allerdings relativ gering und es wird bezweifelt, dass sie für die Pathogenese und Klinik von BP des Menschen eine Relevanz haben (Sitaru, Schmidt et al. 2002, Sitaru, Dahnrich et al. 2007).

Für MMP ergab die Auswertung der Studien andere Ergebnisse. Die durchschnittliche Bindungsrate (grüne Kreise in Abb. 8) an das NC16a-Epitop beträgt hier 42,50%, an den AS-Abschnitt 1080-1107 15% und an den AS-Abschnitt 1200-1497 (das COOH-terminale Ende) 50%. Durchschnittlich 52.5% der Autoantikörper banden an Epitope des extrazellulären BP180 Teiles, eine genaue Eingrenzung dieser Epitope wurde allerdings von den Autoren nicht weiter beschrieben.

Wie bereits oben erwähnt, wurden weitere antigene Strukturen, die von Autoantikörpern von MMP Patienten gebunden werden, nachgewiesen. Neben der NC16a-Region stellen vor allem das COOH-terminale Ende des BP180 wie auch Laminin-5 (Olivry, Dunston et al. 2001) und das $\alpha_6\beta_4$ -Integrin (Tyagi, Bhol et al. 1996) Zielstrukturen für MMP-Autoantikörper dar.

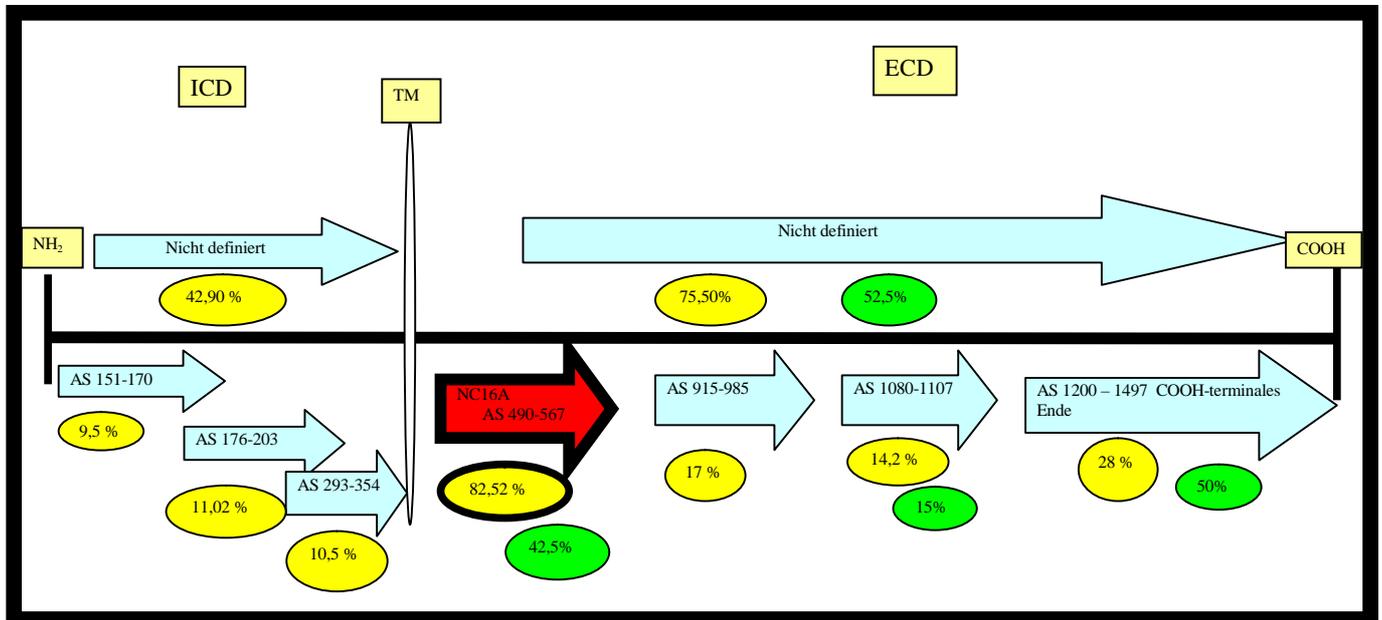


Abbildung 8 : Die Abb. zeigt eine der drei 180-kDA Ketten des Homotrimeren BP180. Die Pfeile symbolisieren die AS-Abschnitte, welche antigenes Potential in den oben erwähnten Studien zeigten. Die Kreise beinhalten die durchschnittliche Antikörper-Bindungsrate an diese Epitope. gelbe Kreise = BP, grüne Kreise = MMP, roter Pfeil/Kreis= NC16a AS-Sequenz/Bindungsraten; ICD = intrazelluläres Department, TM = transmembraner Teil, ECD = extrazelluläres Department.

2.1.5.2.4.3.2 Antigenität von NC16a in der Tiermedizin

Wie in Punkt 2.1.1 (Inzidenz von BP/MMP) noch eingehender erläutert, gibt es bisher wenige Veröffentlichungen, die sich mit dem Thema „canines BP oder MMP“ beschäftigen. Somit war es uns auch nicht möglich eine vergleichbare Literaturanalyse bezüglich der Antigenität von NC16a beim caninen BP/MMP, wie wir es in Punkt 2.1.5.2.4.3.1 (Antigenität von Nc16a in der Humanmedizin) gemacht haben, durchzuführen.

Olivry et al. gelang es nachzuweisen, dass wie beim Menschen auch bei der Katze (Olivry, Chan et al. 1999), dem Pferd (Olivry, Borrillo et al. 2000) und dem Hund (Xu, O'Toole et al. 2000) die Autoantikörper von BP gegen Epitope in der NC16a-Region des BP180 gerichtet sind. Auch bei MMP wies er nach, dass 11 von 17 (64,71 %) getesteten

MMP-Patientensera positiv mit synthetisch hergestellten NC16a-Peptiden in ELISA- und Immunoblot-Studien reagierten (Olivry, Dunston et al. 2001).

Ziel der von Xu et al. 2000 (Xu, O'Toole et al. 2000) veröffentlichten Studie war es, die cDNA, welche für die NC16a-Region des BP180 kodiert, abzugrenzen und die antigenen Strukturen, welche von den BP-Autoantikörpern erkannt werden, zu identifizieren. Es gelang ihnen zu beweisen, dass die NC16a-Domänen des Menschen und des Hundes nur zu 58% identisch und zu 71% homolog sind. Sie zeigten allerdings auch, dass Autoantikörper von caninen BP-Patienten mit den gleichen antigenen Epitopen des humanen NC16a reagierten, die auch von humanem BP-Patientenserum erkannt wurden. Somit folgerten sie, dass die caninen Autoantikörper immunologische Gemeinsamkeiten mit den humanen Autoantikörpern aufweisen und, dass die antigenen Strukturen der NC16a-Region bei beiden Spezies weitgehend gleich sein müssen.

2.1.6 Diagnostik

2.1.6.1 Anamnese und Klinik

Die Anamnese und Klinik kann durch die typische Ausbildung von Blasen und den Prädilektionsstellen schon einen ersten Hinweis auf die zugrunde liegende Krankheit liefern. Da es aber, wie zuvor besprochen, eine Vielzahl von autoimmunen blasenbildenden Hautkrankheiten gibt, die sich meist in dem klinischen Bild gleichen, bedarf es weiterer Abklärungen.

2.1.6.2 Histopathologie

Das diagnostische Mittel der Wahl ist die *Histopathologie*. Die Hautbiopsie sollte möglichst eine intakte Blase beinhalten. Im Idealfall sieht man eine saubere Trennung von Epidermis und Dermis, wobei eine intakte Epidermis das Blasendach bildet. Innerhalb der Blase und am Blasenboden findet man meist eosinophile und neutrophile Granulozyten, hin und wieder auch Fibrin (Gross, Ihrke et al. 2005). Die darunterliegende Dermis zeigt meist eine milde Entzündung und ist leicht ödematisiert, und typischer Weise, wenn auch nicht zwingend, findet man eosinophile Granulozyten, die in Reihen oder Gruppen unterhalb der Basalmembran oder der Blase angeordnet sind (Gross, Ihrke et al. 2005) (vgl. Abbildung 9&10).

Um die Wahrscheinlichkeit eines diagnostischen Resultats zu erhöhen, sollten mehrere Proben genommen werden. Wenn klinisch keine intakten Blasen vorliegen, sollten fokale erythematöse Läsionen bioptiert werden, die unter Umständen mikroskopisch schon Veränderungen aufweisen. Die Wahl der Biopsietechnik hängt von der Größe der zu bioptierenden Stelle ab. Da sich die Läsionen in der Epidermis und im oberen Anteil der Dermis befinden, muß nicht allzu tief bioptiert werden, und eine Stanzbiopsie reicht meist aus, um dem Pathologen genügend Material für eine Diagnose zu liefern. Es sollte aber darauf geachtet werden, dass die verwendete Stanze im Durchmesser immer um einiges größer als das zu entnehmende Bläschen ist, da sonst die Gefahr besteht, durch die Scherkräfte, die durch das Rotieren der Stanze entstehen, das Blasendach zu rupturieren. Meist ist eine 6-8 mm Stanze ausreichend, handelt es sich allerdings um sehr große Blasen, wählt man besser die Technik der Exzisionsbiopsie. Wichtig ist, dass man zur Vorbereitung der Biopsieentnahme die Entnahmestelle so wenig wie möglich beeinträchtigt, um eine Verfälschung und spätere Artefakte der Biopsie zu vermeiden. So sollte die Stelle nicht gewaschen oder desinfiziert werden. Wenn nötig, werden die Haare mit einer Schere oder Rasierklinge lediglich gekürzt. Schuppen oder Krusten sollten keinesfalls entfernt werden. Meist reicht eine örtliche Betäubung der Stelle aus, wobei man höchstens 1 ml von 2%-igem Lidocaine pro Stelle verwenden sollte. Auch hier ist es wichtig, die Entnahmestelle zu schonen und die Einstichstelle für die Betäubung neben die Läsion zu setzen. Bioptiert man allerdings an sehr schmerzhaften Stellen, wie beispielsweise an der Nase oder an den Pfoten, sollte man besser eine Vollnarkose mit einem kurzwirksamen Anästhetikum und adäquater Analgesie durchführen sowie den Patienten postoperativ mit schmerzstillenden Medikamenten versorgen (Campbell K.L. 2004, Mueller R.S. 2006).

Bei der Entnahme ist darauf zu achten, das Gewebe nicht unnötig zu quetschen oder zu beschädigen. Man sollte es möglichst im unteren Teil (Dermis) mit einer feinen Pinzette fassen. Danach sollte es sofort in Formalin eingelegt werden, wobei zehn Volumen Formalin pro Volumen Gewebe verwendet werden sollte. Die Wunde wird meist mit einem 3-0 oder 4-0 nichtresorbierbarem monofilamenten Faden in Einzelhäften genäht (Mueller 2006).

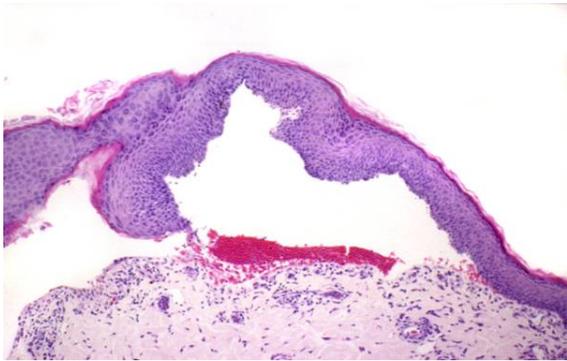


Abbildung 9: Canines MMP, deutliche Trennung der Epidermis und Dermis unterhalb der Basalmembran. Ansammlung von roten Blutkörperchen und neutrophilen Granulozyten innerhalb der Blase. Einwanderung von Entzündungszellen in die obere Dermis (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).

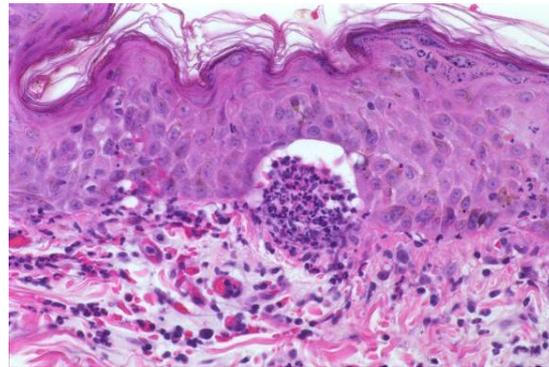


Abb. 10: Canines BP, subepidermale Spaltbildung mit einem von der Dermis ausgehendem Mikroabszess, bestehend aus neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).

2.1.6.3 Immunhistochemische Verfahren

Eine weitere Möglichkeit der Diagnostik ist der Nachweis der Autoantikörper. Zwei etablierte Testverfahren sind der *direkte (DIF) und indirekte (IIF) Immunfluoreszenztest*. In dem direkten Immunfluoreszenztest werden gewebegebundene Autoantikörper, sowie der Komplement-Faktor C3 nachgewiesen (vgl. Abbildung 12). Der indirekte Immunfluoreszenztest dagegen weist zirkulierende Autoantikörper im Serum der Patienten nach. Chan et al. verglichen die Methodik der Immunfluoreszenzmikroskopie, des Immunoblottings und der Enzymdiagnostik bei bullösem Pemphigoid, und zeigten, dass die Sensitivität traditioneller Diagnostik-Methoden, wie der DIF (91%) und der IIF (96%) vergleichbar mit neueren Techniken wie dem Immunoblotting (100%) und dem ELISA (96%) sind (Chan, Sun et al. 2003). Favrot et al. untersuchten die Effekte der Substrat-Wahl auf die Sensitivität des IIF-Tests, und wiesen nach, dass der IIF-Test, durchgeführt an normaler caniner NaCl-Spalthaut, einen zuverlässigen Test zum Nachweis von Autoantikörpern im caninen Patientenserum darstellt (Favrot, Dunston et al. 2003). Die durch NaCl bedingte Spaltung der Haut (meist die Haut der Lippe eines gesunden Hundes) im Bereich der Basalmembranzone führt zur Freilegung und Separierung der verschiedenen Autoantigene. So werden vorhandene Autoantikörper gegen das BP180 beim bullösen Pemphigoid an der epidermalen Seite, also am

Blasendach binden (vgl. Abbildung 11), wogegen Antikörper eines Patienten mit Epidermolysis bullosa acquisita, die gegen das Kollagen VII gerichtet sind, an der dermalen Seite, also am Blasenboden des Spaltes binden werden.

Da die Autoantikörper beim Schleimhaut-Pemphigoid sowohl gegen Antigene im Bereich der epidermalen Seite (BP180, $\alpha_6\beta_4$ -Integrin) als auch gegen Antigene im Bereich der dermalen Seite (Laminin-5) gerichtet sind, wird man hier entweder ein epidermales (vgl. Abb. 11), dermales oder häufig auch ein beidseitiges Fluoreszenzmuster sehen können. Folglich stellt der IIF ein gutes Hilfsmittel dar, durch die spezifische Antikörper-Antigenbindung, zwischen den sich häufig klinisch gleichenden AISBD unterscheiden zu können. Er ermöglicht somit eine genauere Eingrenzung im Gegensatz zu anderen Testverfahren, mit deren Hilfe lediglich die Diagnose einer subepidermal blasenbildenden Hauterkrankung gestellt werden kann.

Es ist allerdings zu erwähnen, dass es meines Wissens kein Labor in Deutschland und nur wenige Labors weltweit gibt, die diesen Test anbieten und auch zuverlässig durchführen. So können die oben erwähnten Erfolgsraten dieser Tests meist nur von Spezialisten erreicht werden.

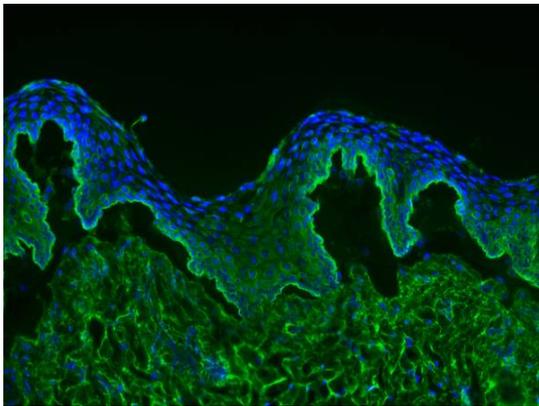


Abb. 11: IIF:Canines MMP. Bindung der Autoantikörper an der epidermalen Seite des Blasendachs (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).

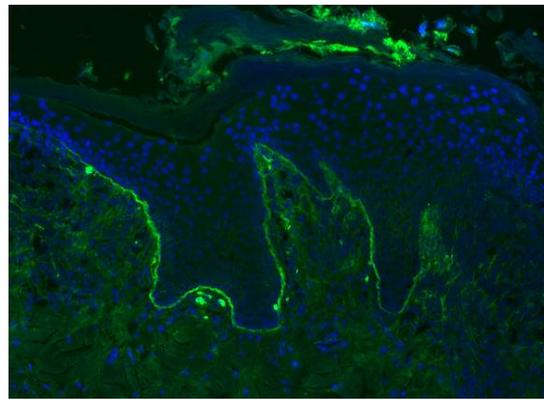


Abb. 12: DIF: Nachweis der IgM gewebegebundenen Autoantikörper eines MMP-Patienten (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).

2.1.6.4 Immunerologische Untersuchung

Immunserologische Untersuchung: ELISA-Tests und Immunoblot-Untersuchungen stellen weitere diagnostische Möglichkeiten dar. Im Bereich der Humanmedizin kommen durch die Aufklärung der Antigenstrukturen der meisten autoimmun blasenbildenen Hauterkrankungen immer mehr auf ELISA basierende kommerzielle Testsysteme auf den Markt.

Abschließend ist hier zu sagen, dass ein positives Resultat eines der oben erwähnten Tests alleine nicht ausreicht eine endgültige Diagnose zu stellen. Diese Tests stellen lediglich Mittel dar, um eine klinische Verdachtsdiagnose zu untermauern und sollten sich idealerweise gegenseitig bestätigen. Eine richtige Diagnosestellung ist bei diesem Krankheitsbild äußerst wichtig, da die erforderliche Therapie mit Immunsuppressiva für den Patienten oft mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden ist.

2.1.7 Therapie

Meist reicht eine topische Behandlung der Läsionen mit immunsuppressiven Medikamenten nicht aus und eine systemische Gabe von Immunsuppressiva ist angezeigt. Hierbei wird vornehmlich Prednisolon oder Methylprednisolon in einer Dosis von 2 mg/kg einmal täglich verabreicht, bis die Läsionen verheilt sind (Medleau und Hnilica 2006). Alternativen zu Prednisolon stellen Dexamethason und Triamcinolon dar. Nach der Heilung der Primärläsionen (meist nach ca. vier bis acht Wochen) sollte die Dosierung langsam, über einen Zeitraum von zwölf bis zwanzig Wochen, ausgeschlichen werden, bis die niedrigste Dosis erreicht wird, die einen erneuten Ausbruch der Krankheit vermeidet. In der Praxis heißt das in der Regel eine langsame und graduelle Verringerung der Dosis bis zum Rezidiv. Danach wird die Dosis verdoppelt, um wieder Remission zu erzielen und dann das Medikament graduell bis zu einer etwas höheren Dosis vermindert als der, bei der der Patient rezidierte. Sieht man innerhalb von zwei bis vier Wochen keine oder keine deutliche Besserung, so spricht der Patient nicht auf diese Therapie an und sie sollte geändert werden. Meist wechselt man dann das Glukokortikoid oder erweitert die bisherige Therapie, indem ein anderes Medikament hinzugefügt wird (Medleau und Hnilica 2006). Generell sollte versucht werden die Dosis der

Glukokortikoide, welche häufig zu erheblichen, manchmal kaum zu tolerierenden Nebenwirkungen führen, durch die Kombination mit nichtsteroidalen immunsuppressiven Medikamenten zu minimieren. So werden vor allem Azathioprin, aber auch Chlorambucil, Cyclosporin, Tetracyclin/Niacinamid und Cyclophosphamid erfolgreich in Kombination mit Kortikosteroiden eingesetzt. Welche Kombination gewählt wird, hängt von dem Schweregrad der Krankheit, der Anamnese, dem Patienten und dessen Besitzer ab. In Tabelle 2 sind die erwähnten Medikamente, deren Dosierung und Nebenwirkungen zusammengefaßt.

Bei Glukokortikoiden sind die wohlbekanntesten klinischen Nebenwirkungen die eines iatrogenen Cushings und erstrecken sich von PU/PD und Polyphagie bei 70-85% der Patienten über Blasen- und Hautinfektionen, Stammfettsucht, dünne Haut, Diabetes mellitus bis hin zu den selteneren Komplikationen wie Hautfragilitätssyndrom bei der Katze oder Hautkalzinose beim Hund. Da die meisten dieser Nebenwirkungen vom Besitzer sehr leicht feststellbar sind, werden in der Regel bei einem Patienten ohne klinische Ausprägung derselben keine Laborproben nötig sein. Die Ausnahme bilden okkulte bakterielle Infektionen der Blase, die bei 40% der Hunde auf längerdauernder Glukokortikoidtherapie auftreten (Ihrke, Norton et al. 1985). Im Einzelfall können Serumbiochemie oder ein ACTH Stimulationstest Anwendung finden.

Azathioprin wird in der Leber zu 6-Merkaptopurin und dann in die aktive Form 6-Thioinosinsäure umgewandelt, welches die Synthese von Adenin und Guanin hemmt. Wenn Thiopurin S-Methyltransferase, das diese Umwandlung katalysiert, bei Patienten nicht aktiv ist, dann kann schnell eine akute Lebertoxizität resultieren (Armstrong, Oellerich 2001). Damit ist bei Azathioprin eine Überprüfung der Leberwerte vor der Therapie und nach einer, zwei und vier Wochen indiziert. Wenn Azathioprin mit Glukokortikoiden verabreicht wird, sind die Glukokortikoidnebenwirkungen ausgeprägter als wenn Glukokortikoide als alleinige Therapie verabreicht werden (Mueller, Krebs et al. 2006). Labordiagnostisch ist in solchen Fällen die alkalische Phosphatase überproportional erhöht, im Gegensatz zur akuten und lebensbedrohenden Lebertoxizität durch Azathioprin, bei der alle Leberenzyme gleichermaßen einen starken Anstieg zeigen.

Chlorambucil, Cyclophosphamid und Azathioprin können eine Knochenmarksuppression hervorrufen, daher sind regelmäßige Blutbilder zum Monitoring nötig. Blutbilder werden bei höheren Dosen (also in der Regel am Anfang der Therapie) wöchentlich bis monatlich, bei geringen Dosen später alle drei bis sechs Monate genommen.

Bei Cyclosporin sowie Tetracyclinen können gelegentliche Serumbiochemien zur Überprüfung der Leberwerte durchgeführt werden, Leber- oder Nierenschädigungen sind allerdings bei diesen Medikamenten sehr selten. Statt Tetracyclin kann auch Doxycyclin in einer Dosis von 10 mg/kg täglich eingesetzt werden.

Neben der immunsuppressiven Therapie ist nach klinischer und zytologischer Untersuchung oft eine systemische Gabe von Antibiotika über mindestens vier Wochen angezeigt, um Sekundärinfektionen der Haut zu behandeln oder in schweren, noch nicht infizierten Fällen zu verhindern (Ihrke, Norton et al. 1985). Eine zusätzlich symptomatische lokale Therapie mit antibakteriellen, desinfizierenden Shampoos ist in vielen Fällen hilfreich.

Wirkstoff	Anfangs-Dosis	Erhaltungs-Dosis	Nebenwirkungen
Prednison/ Methylprednisolon	1-3 mg/kg po alle 12-24 h/ 2-2.5 mg/ kg alle 12-24 h	0,5-2 mg/kg po alle 48 h / 2,5-5 mg/kg po alle 2-7 d	Zeichen eines iatrogenen Cushing Syndroms: PU/PD, Polyphagie, Sekundärinfektionen, Muskelschwund, Leistungsschwäche, Calcinosis Cutis, erhöhter Blutzuckerspiegel
Dexamethason	0,1-0,2 mg/kg po alle 12-24 h	0,05-0,1 mg/kg po alle 48-72 h	Vergleiche Prednison/ Methylprednisolon
Triamcinolon	0,1-0,3 mg/kg po alle 12-24 h	0,1-0,2 mg/kg po alle 48-72 h	Vergleiche Prednison/ Methylprednisolon
Azathioprin	1,5-2,5 mg/kg po alle 24-48 h	0,5-2,5 mg/kg po alle 48-72 h	Nausea, Erbrechen, Durchfall, Sekundärinfektionen, Knochenmarkssuppression, Hepatotoxizität, Cholestase
Chlorambucil	0,1-0,2 mg/kg po alle 24 h	0,05-0,1 mg/kg po alle 48-72 h	Nausea, Erbrechen, Durchfall, Anämie, Lethargie, Anorexie
Cyclosporin	5-12.5 mg/kg po alle 12-24 h	2,5-5,0 mg/kg alle 24-48 h	Erbrechen, Durchfall, Anorexie, Lymphadenopathy, Fellveränderungen
Tetracyclin/ Niacinamid	Hd>10 kg: je 500 mg alle 8 h Hd<10 kg: je 250 mg alle 8 h	Hd>10 kg: je 500 mg alle 12-24 h Hd<10 kg: je 250 mg alle 12-24 h	Nausea, Erbrechen, Gelbfärbung der Zähne bei Welpen, Hepatotoxizität
Cyclophosphamid	1,5 mg/kg po alle 48 h	0,75-1,5 mg/kg po alle 48 h	Nausea, Erbrechen, Durchfall, Knochenmarks-suppression, Lethargie, Alopezie, Fellveränderungen

Tabelle 2: Immunsuppressive Medikamente, deren Dosierung und Nebenwirkungen
(po–per os, h–Stunde)

2.1.8 Prognose

Mit fachgerechter und rechtzeitiger Behandlung besteht bei vielen Patienten durchaus die Chance, klinische Remissionen zu erzielen und auch längerfristig zu erhalten. Die Aussicht auf eine vollständige Heilung ist jedoch gering. Meist ist eine lebenslange Behandlung mit immunsuppressiver Therapie notwendig, um die Erkrankung unter Kontrolle zu halten.

III. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Einschlusskriterien der Hunde

In unsere Studie wurden Sera von 26 Hunden eingeschlossen. Die Sera stammen hauptsächlich von Patienten aus den USA, welche von Prof. Dr. Olivry behandelt wurden, oder wurden von Tierärzten aus den USA und Europa eingeschickt. Tierärzte, die Sera von BP/MMP Patienten an die NCSU schickten, mußten ein detailliertes Formular (Anhang: Punkt 9.4) mit genauer Beschreibung der Läsionen, deren Lokalisation, Dauer und Verlauf der Erkrankung sowie der bisherigen Diagnostik, Behandlung und eventuellen Therapieerfolgen beilegen.

Bei 19 dieser Hunde wurde MMP, bei sechs BP und bei einem Hund Pemphigus gestitationes diagnostiziert. Die Sera wurden im Verlauf von mehreren Jahren gesammelt und bei -80 ° C gelagert. Um in diese Studie aufgenommen zu werden, mußte BP bzw. MMP anhand der Klinik des Tieres oder histopathologischen Befunden diagnostiziert worden sein. Außerdem wurde an der NCSU in jedem MMP/BP Serum Autoantikörper gegen Strukturproteine der Balsalmembranzone mittels eines indirekten Immunfluoreszenztests nachgewiesen (Siehe Punkt 3.2.1.2).

3.1.1.1 Signalement der in unserer Studie mitwirkenden Hunde

In unserer Studie waren folgende Rassen vertreten: Deutscher Schäferhund (n=9), Dachshund (n=3), Zwergpudel (n=1), Greyhound (n=2), Boxer (n=1), Catahoula Leopard (n=1), Shar-Pei (n=1), Akita (n=1), Border Collie (n=1), Weimaraner (n=1), Irish Setter (n=1), Tibetan Spaniel (n=1), Mischlinge (n=3). Sieben Hunde waren männlich, sechs männlich-kastriert, zwei weiblich und elf weiblich-kastriert.

Der jüngste Hund war beim Ausbruch der Krankheit neun Monate alt, der älteste 15 Jahre. Tabelle 5 zeigt die verwendeten Sera, das dazugehörige Patienten-Signalment und den Titer, bis zu welchem eine Antikörper-Antigen-Bindung im IIF durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden konnte.

Tabelle 3 gibt das Signalment aller in unserer Studie vorkommenden Hunde wieder.

Hunde	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Titer des IIF an SSL
BP 1	Weimaraner	m	5	1:500
BP 2	Zwergpudel	wk	2,5	1:250
BP 3	Dackel	m	9 mon.	1:50
BP 4	Dackel	m	5	1:20
BP 5	Greyhound	w	6	1:10
BP 6	Boxer	m	6	1:40
MMP 1	Deutscher Schäferhund	mk	3	1:50
MMP 2	Deutscher Schäferhund	mk	6	1:10
MMP 3	Deutscher Schäferhund	wk	3	<1:10
MMP 4	Greyhound	mk	9	1:20
MMP 5	Deutscher Schäferhund	wk	12	1:20
MMP 6	Deutscher Schäferhund	w	3	1:10
MMP 7	Irish Setter	wk	7	<1:10
MMP 8	Border Collie	mk	7	1:500
MMP 9	Deutscher Schäferhund	wk	4	<1:10
MMP 10	Dackel	wk	15	1:25
MMP 11	Akita	wk	6	1:10
MMP 12	Mischling	wk	6	1:10
MMP 13	Corgi Mischling	m	1	<1:10
MMP 14	Catahoula Leopard	wk	5	1:10
MMP 15	Deutscher Schäferhund	m	9	<1:10
MMP 16	Chow Mischling	mk	4	1:50
MMP 17	Deutscher Schäferhund	mk	5	1:10
MMP 18	Shar-Pei	m	11	1:20
MMP 19	Deutscher Schäferhund	wk	6	1:20
PG 1	Tibetan Spaniel	wk	4	1:400

Tabelle 3: Signalement der verwendeten Patienten-Sera und den Titern, bis zu welchem eine Antikörperbindung im IIF sichtbar gemacht werden konnte.

3.1.2 Material

Material (Verbrauchsmaterial, gebrauchsfertige Testkits, Chemikalien, Zellen, Bakterien, Plasmide, Media sowie Rezepte und verwendete Antikörper) und Geräte werden im Anhang aufgeführt.

3.2 Methoden

3.2.1 Indirekter Immunfluoreszenztest an Salzspalthaut

3.2.1.1 Prinzip

Das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz beruht auf der Bindung von Antikörpern (primäre Antikörper) an spezifische Antigenstrukturen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip, in unseren Fall die Bindung der Autoantikörper von MMP/BP Patienten an die in Punkt **2.1.5.2** besprochenen Proteine der Basalmembranzone der Gewebeschnitte. Um diese Autoantikörper sichtbar zu machen, verwendet man sekundäre Antikörper, die mit Fluoreszein gekoppelt und gegen die primären Antikörper gerichtet sind. Handelt es sich bei dem primären Antikörper um canines, im Serum vorhandenes, IgG so verwendet man als sekundären Antikörper einen Anti-Hund-IgG-Antikörper. Das Fluoreszein ermöglicht es später die Antigen-Antikörper Bindung unter einem Epifluoreszenz-Mikroskop sehen zu können.

3.2.1.2 Durchführung

Als Substrat für den IIF wurde normale canine Salz-Spalthaut verwendet. Die Spaltung zwischen Epidermis und Dermis wird durch eine 24-stündige Inkubation des Gewebes in einer 1 M Natrium Chlorid Lösung erreicht. Es hat sich bewährt, für den IIF Lippen-gewebe von normalen Hunden zu verwenden.

Die Salz-Spalthaut wurde in flüssigem Stickstoff gefroren. Mit Hilfe einer speziellen Gefrier-Schneidemaschine wurden bei -20°C 4-6 μm dicke Kryoschnitte angefertigt und auf einen Objektträger aufgebracht. Um eine Haftung der Schnitte auf dem Glas zu erreichen, wurden diese für weitere zehn Minuten bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet und danach für zehn Minuten in Aceton fixiert. Eine spätere Anlagerung von unspezifischen Antikörpern wurde durch eine 30 minütige Inkubation in 0,5% fetalem Kälber-Serum gehemmt. Als nächstes wurden 400 μl des zu untersuchenden Serums in verschiedenen Verdünnungen (in PBS verdünnt) auf die Objektträger gegeben und für eine Stunde in einer feuchten Kammer gelagert, bevor sie in einer mit PBS gefüllten Küvette gewaschen wurden. Um die Antikörper unter einem Epifluoreszenz-Mikroskop sichtbar zu machen, wurde ein sekundärer Fluoreszein-konjugierter anti-Hund-IgG

Antikörper für weitere 30 min in einer dunklen Feuchtkammer aufgetragen. Nach einem zehnmütigen Waschgang in PBS wurden die Objektträger 20 Sekunden in 250 ml PBS, welches zwei Tropfen Evans Blue enthält, getaucht. Die Gegenfärbung der Schnitte mit Evans Blue, einem Azofarbstoff, gewährt einen besseren Kontrast der Fluoreszenz. Als letztes wurden die Gewebe mit einem Mounting Medium beschichtet, um die Fluoreszenz längere Zeit zu erhalten. Wir verwendeten Vectashield, welches zusätzlich noch DAPI enthält. 4',6-Diamidin-2-phenylindol ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der zur Markierung der DNA eingesetzt wird. Nach Anbringen eines Deckglases wurden die Objektträger unter einem Epifluoreszenz-Mikroskop evaluiert.

3.2.2 Gewinnung der DNA zur Herstellung des NC16a-Fragments

3.2.2.1 RNA Extraktion

Für die RNA Extraktion verwendeten wir Trizol[®]. Trizol ist ein gebrauchsfertiges Reagenz, welches für die Isolation von RNA aus Gewebe oder Zellen verwendet wird. Dabei sichern dessen Bestandteile – Phenol und Guanidine Isothiocyanat – die Integrität der RNA, während andere Zellbestandteile aufgelöst werden. Eine Gefahr im Extraktionsprozess stellen ubiquitär vorkommende RNasen dar. Sie können die RNA degradieren. Somit ist darauf zu achten, dass nur RNase freie Materialien, wie Einmalhandschuhe, sterile Plastikröhrchen und Pipetten verwendet werden und die Umgebung frei von mikrobieller Kontamination gehalten wird.

3.2.2.1.1 Durchführung

Biopsien von caninem Lippengewebe wurden homogenisiert und mit 1 ml Trizol pro 100 mg Gewebe versetzt, indem mehrmals auf und ab pipettiert wurde.

Die Mischung wurde dann fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt und das geschlossene Röhrchen wurde 15 Sekunden mit der Hand geschüttelt und dann bei Raumtemperatur für drei Minuten inkubiert. Als nächstes wurde das Röhrchen bei 8° Celsius mit 12,000 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Das Zentrifugieren sollte in einer Auftrennung der Flüssigkeit in eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine obere farblos wäßrige Phase resultieren. Diese obere wäßrige Phase wurde dann in ein neues 1,5 ml

Röhrchen verbracht. Durch das Mischen mit 500 µl Isopropyl Alkohol und einer anschließenden zehn minütigen Inkubation bei Raumtemperatur kommt es zu einem Ausfällen der RNA. Wieder wurde das Röhrchen bei 8° Celsius mit 12,000 x g für zehn Minuten zentrifugiert und die ausgefällte RNA wurde dann als Gel-ähnliches Pellet sichtbar. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und zum Waschen des RNA Pellets wurde 1 ml von 75%igem Äthanol beigefügt, vermischt und bei 8° Celsius mit 7500 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Als letztes wurde der Überstand entfernt, die RNA bei Raumtemperatur für zehn Minuten getrocknet und in 30 µl RNase freiem Wasser resuspendiert.

3.2.2.2 RNA Messung

Um die Konzentration der extrahierten RNA zu ermitteln, wurde eine photometrische Messung durchgeführt. Mit Hilfe des Nano Drop® ND-1000 Spectrometers wurde die RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen ein Lösungsmittel (Aqua bidest.) gemessen. Das Spektrometer errechnet dann den Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm und zeigt somit an, ob eine Verunreinigung der RNA vorliegt. Reine RNA hat einen Wert von 2,0.

3.2.2.3 Reverse Transkription in cDNA

Der Begriff reverse Transkription beschreibt den Vorgang der Umwandlung von RNA in cDNA. Dazu verwendeten wir den „Reverse Transcription-Kit“ von Promega. In diesem Reagenziensystem sind sogenannte Random Primer – kurze nach dem Zufallsprinzip synthetisierte Oligonukleotide - enthalten, welche mit der RNA hybridisieren, so dass die cDNA mit Hilfe der Transkriptase gebildet werden kann. In Anlehnung an das vom Hersteller bereitgestellte Protokoll, wurde folgendes Rezept verwendet:

Rezept:

4µl Magnesium-Chlorid (25 mM)

2µl Reverse Transkriptionspuffer-Lsg.

2µl dNTP Mischung (10mM)

0,5µl Rekombinanten RNase Ribonuklease Inhibitor

15u AMV Reverse Transkriptase

0,5µg Random Primers

1µg RNA

Diese Mischung wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und zehn Minuten bei Raumtemperatur gelagert, um ein Anlagern der Primer zu gewährleisten. Dann wurde sie 15 Minuten bei 42°C inkubiert, dabei wurde die RNA in cDNA überschrieben. Zur Inaktivierung der Transkriptase und um eine Anlagerung der Transkriptase an die cDNA zu verhindern, wurde die Mischung für fünf Minuten auf 95°C erhitzt und danach für fünf Minuten bei 0 – 5 °C abgekühlt, um die Reaktion zu beenden. Dann wurde die entstandene cDNA auf 100 µl mit Nuklease freiem Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

3.2.2.4 PCR

Die PCR ermöglicht es, einen kurzen definierten Teil eines DNA-Stranges *in vitro* zu vervielfältigen. Dies geschieht in einem Thermocycler, einem Gerät, welches die erwünschten Reaktionstemperaturen präzise herstellen kann. Eine PCR umfaßt meist 25-50 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus jeweils drei Schritten besteht:

1. *Denaturierung*: Die Erhitzung des DNA-Gemisches auf 94-96 °C führt durch das Aufbrechen der Wasserstoffbrücken-Bindungen zur Trennung der doppelsträngigen DNA.

2. *Primer Anlagerung*: Je nach verwendetem Primer liegt die Temperatur bei diesem Schritt zwischen 50-65°C.

3. *Elongation*: In diesem Schritt bildet die DNA-Polymerase, beginnend am 3'-Ende durch Anlagerung freier Nukleotide, den fehlenden komplementären DNA-Strang. Auch

hier richtet sich die Temperatur nach der verwendeten Polymerase und liegt meist zwischen 68-72°C.

Um eine PCR durchführen zu können müssen Original-DNA, ein Vorwärts- und ein rückläufiger Primer, eine DNA Polymerase, Desoxynukleosidtriphosphat, Magnesium Ionen und ein PCR – Puffer vorhanden sein.

3.2.2.4.1 Primerkonstruktion

Primer bestehen aus kurzen, chemisch synthetisierten Oligonukleotiden und sind definiert als kurze DNA-Stränge, die für die PCR das zu replizierende DNA-Fragment anzeigen. Sie lagern sich an das 3'-Ende der zu replizierenden DNA-Sequenz an und stellen so der DNA-Polymerase mit ihrem 3'-OH-Ende einen Startpunkt für die DNA-Replikation bereit.

Nach Ermittlung der zu amplifizierenden Sequenz wurden passende Primer hergestellt. Dabei muß man sich vor allem nach der Schmelztemperatur der Primer richten, welche mit der Länge der verwendeten Primer wächst. Sie sollte zwischen 55 und 65 °C liegen, was einer Primer-Länge von 20-30 Nukleotiden entspricht. Steigt die Länge und somit die Schmelztemperatur, so können verwendete Enzyme (DNA-Polymerase) denaturieren. Ist die Länge bzw. die Temperatur zu gering, hybridisieren die Primer nicht richtig mit der Template-DNA und es kann zu unspezifischen Anlagerungen der Primer kommen.

Ein Artikel von Xu et al. (Xu, O'Toole et al. 2000) lieferte uns die zu amplifizierende canine NC16a-Sequenz:

```

cttggagaaaacatcaggaggagaaaagagagaggggggtttcttcaasgttggtttccagtcacctaccagttctcagagaaggtgggatggt
99
ATGGATGTAACCAAGAAAAACAAGAGAGATGGCTCTGAAGTCACTGMAAGAATTATCACGGAGACAGTATCCACAAGACTTACATCCTTACCACCAAAA
M D V T K K N K R D G S E V T E R I I T E T V S T R L T S L P F K
198
GGGGAAACCAGCAACGGCTATGCTAAAACAGGCTCTCTTAGTGGAGGGAGCCGGCTGGAGAAGCACAGCTTGACACATGGCAGCAGTGGCTACATAAAC
G G T S N G Y A K T G S L S G G S R L E K H S L T H G S S S G Y I N
297
TCAAGTGGAGCACACGAGGCAATGCCTCCACCTCCAGTTACAGGAGGGCTCATTCCTCCGCTCCACTCTGCCAAGCTCACCAGGCTCCACCTTTGAA
S S G S T R G N A S T S S Y R R A H S P A S T L P N S P G S T F E
396
GGGAAAATTCACATCACCCGCCATGGAACATACGAAGGGAGCTCCAGTGGCAACTCTTCTCCAGAGTATCCTCGGAAGGAGTTCGCATCTTCTTCAACC
G K I H I T R H G T Y E G S S S S G N S S P E Y P R K E F A S S S T
495
AGAGGAAGGACCAACACGAGAGAGCGAAATCCGAGTTCGACTCGAGAGTGCATCCCCATCCCGATGGACAGAATGGATGATGTTAAGCGTTTG
R G R S Q T R E S E I R V R L Q S A S P S T R W T E L D D V K R L
594
CTGAAAGGGAGCCGATCAGCAAGTGTGAGTCCCACCCGGATTCCTCCAACACACTACCCATCCCCAAGAAAGGCCAGGTAGAGACCAAAATGGTGACA
L K G S R S A S V S P T R D S S N T L P I P K K G T V E T K M V T
693
GCAAGCTCCCAGTCGGTGTCTGGCACCTATGATGCCACCATCTTGGATGCCAACCTTCCCTCCACATGTGGTCTCCACCTTGGCCGGCAGGGTCTCC
A S S Q S V S G T Y D A T I L D A N L P S H M W S S T L P A S S
792
ATGGGACCTATCACAACAAGTGCACACCCAGAGCTCATCCCTCCCTCAACACCAACCCCTATTCGTCAGGATCAGTCTTCGGAGTTCACAAATAACATG
M G T Y H N N V T T Q S S S L L N T N A Y S A G S V F G V P N N M
891
ACGTCAGGCTCTTCCACACTGCACCCCGGGTCCAGCACCTGCTCCTCAGTGTTCGGATGCAGAACACCTGGCACCCAGCTCGTCCACCTGCTCCACC
T S G S S T L H P F T C S S V F G M Q N N L A P S S T L S H
990
AGCACGGCCACCGCTCCACAGCATATGGTATGAAGAAAACCTGCCCCAGAGCCCTGCCGTTGTGAGCACTGGTGTGCCACCTCTGCACGCTGCACC
S T A T A Y T A Y G M K K N L P Q S P A V V S T G V S T S A A C T
1089
ACAAATGTCOCGAATGAGGATCTCTTGCACAAGGACTGTAAATCTCTGATCCTGGAGAAAGACAACACACAGCCAAAGAGGAGATGGAGCTGCTGATC
T N V Q N E D L L H K D C K F L I L E K D N T P A K K E M E L L I
1188
ATGACCAGGACAGCGGGAAGGTCCTTCACTGCGCTCCCTGCGCAGCATCGCTGCAACTCTTTTTCAGATGACACCCCTCAAAAAGAAAAGCAAGCTGCC
M T K D S G K V F T A S P A S I A A T S F S D D T L K K E K Q A A
1287
TACACTGCTGACACCTGCCTGGTATCAGACCGCAATGGAGAGCTGAAGACTGTGTCACCAAGGGAAAGGCTGCTCTGCAGAATGCACAACATCAAC
Y T A D T C L V S D A N G D V K T V S T K G K A A S A E M H N Y N
1386
CATCGTGGTGGTGGCAGTGGTGGTGGTGGCGGTGGTGGCGGGTGGCGGTGGTGGCCATGGGGAGCAGCGCCAGCTGGTGGCCCTGTGGCTCCTG
H R G G G S G G G G G G G G G G G G P W G A A P A W C P C G S C
1485
TGCAGCTGGTGGAAAGTGGCTACTGGGCTGTGCTCACCTGGCTGCTGCTCCTGGGCTACTCTTTGGCCTCATGCTCTGGCTGAGGAGGTGAGGGCG
C S W W K W L L G L L L T W L L L L G L L F G L I A L A E E V R A
1584
CTGAAGGCACGGGTGGCAGAGCTGGAGCAGAGCCGGCAACGTGCTGCTTTTCAAGGAGGAGATCAACCGGCCAACAAAGGACTGGCTGCAGGGGGAA
L K A R V A E L E Q S R S N V L L F K E E M Q R A N K D W L Q G E
1683
GCGCCAGCCTGGAAGCAGGGGAGGCAAACTAGGCTTGACGGCCACAGCAGGAGGAGCTCTGGCTGTTCTGAGGAACAGGTGATGGCCGAGCAA
A P S V E A G E A K L G L D G H Q Q E E L W L F V R N R L M A E Q
1782
GAAAAACGAAATCTCCGAGGAAGCCCTGGCCCTAAAGGTGACATGGGAAGTCAAGGCCCTAAAGGAGACCGAGGGCTCCCCGGGACTCCAGGCATCCCT
E N G N L R G S P G P K G D M G S Q G P K G D R G L P G T P G I P
1881
GGGGTCTTGGGCCACCCGGTCCACAAGGACCAAAAGGACAAAAGGCAAGTGTGGGAGAACCCAGGCATGGAGGGACCCATGGGGCAAAAAGGGCGAGAA
G V L G H P G P Q G P K G Q K G S V G E P G M E G P M G Q K G R E
1980
GGCCCATGGGACCTCGTGGTGAACAGGGCTCCTGGATTTGGAGAGAAAGGGACAGAGGGCTGCTGGTGAACCCCGTGTTCAGGGCCACCTGGC
G P M G P R G E P G P P G F G E K G D R G A A G E P G V Q G P P G
2079
GTCCAGGATCTGTGGTCCCAAAGGTCTTGGCGGTTCTCCAGGCCACCGGGTCCCGCAGGCCCTATGGGTCCACAAGGGCTCCGAGGTGAAGTGGAA
V F G S V G P K G S G G S P G P R G P P G P M G P Q G L R G E V G
CTCCCTGGTATCAAAGGTGACAAAGGACCTCTGGGATCAACAGGACCC
L F G I K G D K G F L G S P G F

```

Abb. 13: Nukleotide und die abgeleitete AS-Sequenz des BP180. Die abgeleitete AS-Sequenz beinhaltet die gesamte Intrazelluläre Domäne (AS 1–467), das transmembranöse Segment (unterstrichen, AS 468–490), die extrazelluläre NC16a-Sequenz (durch T und T eingeklammert, AS 491–567), und das schmale Segment des extrazellulären Kollagen-Segments (nur teilweise, AS 568–709) (GenBank accession no. AF016649) (Text und Abb.: (Xu, O'Toole et al. 2000)).

Um die passenden Primer herzustellen, verwendeten wir das 3 Plus Programm (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) und bestellten die konstruierten Primer dann bei IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA).

Primer-Sequenz - NC16a Vorwärts: 5' - GTT ATG GAG GAG GTG AGG GCG - 3'

Primer-Sequenz - NC16a Rückläufig: 5' - TCG GAG ATT TCC GTT TTC TTG C - 3'

3.2.2.4.2 PCR Durchführung

Wie bereits in Punkt 3.2.2.4 beschrieben braucht man zur Durchführung einer PCR mehrere Komponenten. Unser PCR-„Rezept“ sah folgendermaßen aus:

2,5 µl 10 x konzentrierter PCR Puffer-Lösung (Coral Load, Quiagen - Valencia, CA)

1,0 µl Vorwärts- Primer

1,0 µl Rückläufiger Primer

2,0 µl dNTP

0,5 µl DNA-Polymerase (Hotstar Taq Plus, Quiagen - Valencia, CA)

17,0 µl Wasser

1,0 µl canine cDNA

Die Primer wurden mit 2x konzentrierter PCR Puffer-Lösung zu 200 µM verdünnt.

Wir verwendeten folgendes Thermocycler – Programm:

95 °	für 5 min	} 35 Wiederholungen
95 °	für 15 sec	
52,7 °	für 30 sec	
72 °	für 30 sec	
72 °	für 10 min	

3.2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese macht es möglich, DNA-Stränge ihrer Größe nach aufzutrennen und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV- Licht sichtbar zu machen. Durch das Anlegen einer konstanten Spannung wandern die DNA-Stücke aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung der positiv geladenen Anode. Das Gel wirkt hierbei wie ein Sieb und läßt kleinere Moleküle schneller passieren. So werden die einzelnen DNA-Stücke aufgetrennt und mit Hilfe eines Referenz-Markers mit vordefinierter Größe kann die Größe der einzelnen DNA-Stücke ermittelt werden.

3.2.2.5.1 Durchführung

Wir verwendeten ein 2%-iges Agarosegel, um die PCR-Produkte elektrophoretisch aufzutrennen. Dazu wurden 4 g Ultrapure Agarose in 200 ml 1xTAE aufgelöst und auf höchster Stufe in der Mikrowelle erhitzt, bis die Mischung vollkommen verflüssigt und homogen war. Der Erhitzungsvorgang mußte mehrmals unterbrochen werden, um die Mischung umrühren zu können. Dann wurde das Gemisch abgekühlt, bevor es in eine Elektrophoresekammer mit Probentaschenkamm gegossen wurde. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel mit 1 x TAE Puffer überschichtet. 5 µl des PCR-Reaktions-Gemisches und 7 µl des Kontroll-Markers wurden in die vorhandenen Vertiefungen des Agarosegels pipettiert. Durch die im PCR-Puffer und Marker enthaltenen Farbstoffe kann die aufgetragene Lösung während der elektrophoretischen Auftrennung sichtbar gemacht werden. Es wurde eine konstante Spannung von 85 V angelegt. Nach 15 Minuten wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Gebrauchslösung (100ul der 10mg/ml Lsg. Pro Liter TAE-Lsg.) für ca. eine Minute unter Schwenken gefärbt. Danach wurde ein weiteres Mal die Spannung an das Gel gelegt. Die aufgetrennte DNA konnte nun durch UV-Licht sichtbar gemacht und ihre Größe durch Vergleich mit einem Standard bestimmt werden.

3.2.2.6 DNA-Extraktion

Das gewünschte DNA-Fragment (2,2 KB) wurde mit Hilfe einer DNA-Exzisions-Pipette aus dem Agarosegel geschnitten und nach Anweisungen des MinElute Gel Extraction Kit Protokolls von Quiagen von dem Gel gesäubert.

3.2.3 Klonierung

Als Klonierung bezeichnet man das Verbringen eines DNA-Fragments in einen Vektor. In der Molekularbiologie wird meist ein Plasmid als Vektor verwendet. Das Plasmid wird mit Hilfe von Restriktionsenzymen so geschnitten, dass ‚sticky ends‘ (überstehende Enden) entstehen. Dieselben Restriktionsenzyme schneiden auch die Enden des zu integrierenden DNA-Teiles, somit entstehen kompatible Enden, welche hybridisieren und durch eine Ligase fest verbunden werden können.

3.2.3.1 Vektor:pcDNA3.1/V5-HIS-TOPO Plasmid

Nach der DNA-Extraktion klonierten wir das NC16a-Fragment nach Anleitung des TOPO Cloning Reaction Kit Protokolls in ein pcDNA 3.1/V5-HIS-NC16a-Plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA). Dabei fungierte die in diesem Kit enthaltene DNA-Topoisomerase I sowohl als Restriktionsenzym als auch als Ligase. Die Topoisomerase schneidet das PCR Amplifikon derart, dass es am 3'-Ende einen Adenin Überhang hat und sich so bestens an das geschnittene Thymin Ende des 3'-Plasmids anlagern kann.

Ein Gemisch bestehend aus dem PCR Produkt, Salzlösung, sterilem Wasser und dem TOPO Vektor wird dazu für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf Eis gelagert, bis das Plasmid transformiert wird.

3.2.3.1.1 Transformation in E.coli

Durch Vektoren können beliebige DNA-Sequenzen in Empfängerzellen (z.B. Bakterien) gebracht werden. Dieser Vorgang wird Transformation genannt. Werden Bakterien als Wirtszelle verwendet, so erlangt man durch die Bakterienvermehrung durch Zellteilung schnell eine große Anzahl an Bakterien-Klonen, die alle das gewünschte DNA-Fragment beinhalten.

3.2.3.1.1.1. Durchführung

Das pcDNA 3.1/V5-HIS-NC16a-Plasmid wurde in One Shot®TOP10 E.coli (Invitrogen, Carlsbad, CA) transformiert.

Dazu wurden 2 µl des Plasmid Gemisches in ein mit One Shot®TOP10 *E.coli* Bakterien gefülltes Röhrchen gefüllt, vorsichtig gemischt und fünf bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde das Gemisch für drei Sekunden in ein 42°C heißes Wasserbad verbracht und danach sofort wieder in Eis überführt. 250 µl SOC Medium (Nährmedium für Bakterien) wurden hinzugefügt und die Mischung wurde dann für eine Stunde bei 37 °C horizontal geschüttelt.

3.2.3.1.2 Anzüchtung der Bakterien

Nach der Transformation wird das *E.coli* – Gemisch auf Selektivplatten aufgetragen und diese bei 37 °C über Nacht bebrütet.

3.2.3.1.2.1 Auf Ampicillin Platten

Wir verwendeten Selektivplatten aus Lb-Medium, ein spezielles Nährmedium für Bakterien, welches Ampicillin enthielt. Ampicillin, ein gebräuchliches Antibiotikum, läßt nur Bakterien wachsen, welche das pcDNA 3.1/V5-HIS-NC16a-Plasmid enthalten, das neben dem NC16a-Fragment auch ein Resistenzgen gegen Ampicillin enthält. Es wurden zwei Platten angezüchtet, wobei eine Platte mit 50 µl transformierten *E.coli*, die andere mit 200 µl beimpft wurde. Durch das Beimpfen von mehreren Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen versuchten wir sicher zu stellen, dass mindestens eine Platte später gleichmäßig verteilte Kolonien hervorbrachte.

3.2.3.1.2.2 In Lb- Flüssigmedium

Es wurden zehn Kolonien der Ampicillinplatten ausgewählt und in jeweils zehn Röhren, die 2 ml Lb-Flüssigmedium und 0,05mg/ml Carbenicillin enthielten, bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Anzüchtung im Flüssigmedium sicherte eine große Vermehrung und Bereitstellung der DNA, welche dann zur weiteren Analyse zur Verfügung stand.

3.2.3.1.3 PCR

Es wurde eine weitere PCR durchgeführt. Dafür wurden die gleichen Primer, wie in Punkt 3.2.2.4.1 beschrieben, verwendet:

Primer-Sequenz - NC16a Vorwärts: 5' - GTT ATG GAG GAG GTG AGG GCG - 3'

Primer-Sequenz - NC16a Rückläufig: 5' - TCG GAG ATT TCC GTT TTC TTG C - 3'

Es wurden zehn PCR Ansätze vorbereitet, die dasselbe PCR-Rezept, wie das in Punkt 3.2.2.4.2 beschriebene, beinhalteten. Allerdings wurde anstelle der caninen cDNA 1µl des transformierten Bakterien-Mixes eingesetzt. Zusätzlich wurde noch GAPDH als Positivkontrolle verwendet.

3.2.3.1.4 Gelelektrophorese

Zum Nachweis, dass die Bakterien das richtige DNA-Fragment inkorporiert haben, wurde nach der PCR eine Agarosegelelektrophorese, wie sie in Punkt **3.2.2.5.1** beschrieben wurde, durchgeführt.

3.2.3.1.5 Wiederholung PCR und Gelelektrophorese

Es wurden zwei Bakterienklone nach den Ergebnissen der Gelelektrophorese ausgesucht, welche das richtige Band (2,2 kb) aufwiesen. Diese wurden ein weiteres Mal auf Ampicillin-Platten und später in Lb-Medium angezüchtet und es wurde nochmals mit Hilfe von PCR und Gelelektrophorese verifiziert, dass sie das richtige DNA-Fragment eingebaut hatten.

Diese zwei Bakterienklone wurden dann in vier 10 ml Lb-Medium Tuben, die jeweils 10 µl Carbenicillin enthielten, bei 37°C über Nacht angezüchtet.

3.2.3.1.6 Reinigung der DNA

Am nächsten Tag wurden die Bakterien für zehn Minuten mit 3400 rpm zentrifugiert, um die sich absetzenden Bakterien vom Medium trennen zu können.

Danach wurde die DNA mit Hilfe des Quiaprep Spin Miniprep Kit von Quiagen nach Angaben des Herstellerprotokolls gereinigt.

3.2.3.1.7 Messung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde mit dem Nano Drop® ND-1000 Spectrometer wie in Punkt **3.2.2.2** beschrieben, gemessen.

3.2.3.1.8 Sequenzierung der DNA

Zur Kontrolle der Sequenz und der korrekten, in-frame-Insertion' wurde die DNA zur Sequenzierung in ein kalifornisches Labor geschickt (MC labs, San Francisco, CA). Die Ergebnisse konnten später im Internet abgerufen werden.

3.2.3.2 Vektor: pND14-Plasmid

3.2.3.2.1 Subklonierung von NC16a

Subklonierung beschreibt eine in der Molekularbiologie verwendete Technik, bei der ein DNA-Fragment von einem Vektor (Plasmid) in einen anderen Vektor verbracht wird.

3.2.3.2.1.1 PCR

pcDNA3.1/V5-HIS-NC16a wurde ein weiteres Mal durch PCR vervielfältigt, wobei folgende Primer verwendet wurden:

Vorwärts-Primer: 5'-GCGGGATCCGAGGAGGTGAGGGCG-3'

Rückwärts-Primer: 5'-CGGGGTACCGGCACAGTCGAGGCTGATCAGCGGG-3'

Diese Primer enthielten 5'-BamHI und 3'-KpnI Restriktionsenden (der unterstrichene Teil der Primer). Der 3'-Primer wurde so hergestellt, dass das V5 und 6-His(tidine) Tag mit vervielfältigt wurden.

Folgendes Rezept und Thermocycler-Programm wurde verwendet:

<u>Rezept:</u>	<u>Thermocycler-Programm:</u>		
2,5µl Coral Puffer Lsg.	95°C	5 min	} 35x
2µl DNTPs	95°C	30 sec	
1µl 20nM Vorwärts-Primer	67°C	30 sec	
1µl 20nM Rückwärts-Primer	72°C	45 sec	
0,5µl Taq (HotStar-Polymerase)	72°C	10 min	
0,5µl NC16a-Plasmid	25°C	∞	
17,5µl H ₂ O			

Die PCR wurde für zwei NC16a-Bakterienklone durchgeführt.

3.2.3.2.1.2 Gelelektrophorese

Beide PCR Ansätze (Klon #2 und #10) wurden mit Hilfe eines 2%-igem Agarosegel nach der in Punkt 3.2.2.5.1 beschriebenen Methode elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.3.2.1.3 Extraktion aus Gel

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet. Die durch die Gelelektrophorese entstandenen DNA-Banden wurden mit Hilfe einer vorgefertigten DNA-Exzisions-Pipette aus dem Gel geschnitten. Die Banden wurden mit Hilfe des Ethidiumbromids unter UV-Licht sichtbar gemacht. Der Betrachter muß bei der Exzision der Banden zum Schutz der Augen vor UV-Licht unbedingt eine Brille tragen.

3.2.3.2.1.4 Reinigung des Plasmids

Das im Gel befindliche Plasmid mußte nun gereinigt werden. Dazu wurde der QIAquick Gel Extraction Kit und das vom Hersteller empfohlene Protokoll verwendet. Die Grundlage dieses Kits stellt ein Vakuumsystem dar, welches mehrere Säulen besitzt. Jede dieser Säulen enthält eine Silikat-Membran, mit der idealen Salzkonzentration und dem idealen PH-Wert um DNA zu binden. Filtriert man nun das durch Wärme verflüssigte Gelgemisch durch die Säule, so bindet die DNA an die Membran und die Fremdstoffe werden vakuumbedingt durch die Membran gezogen. Die DNA kann dann in Tris-Pufferlösung oder Wasser eluiert werden.

3.2.3.2.1.5 Digestion der beiden Plasmide

Es wurden Digestionsansätze für das Plasmid pcDNA3.1/V5-HIS-NC16a und pND14/DSG1 angesetzt. Zum Schneiden der DNA wurden die beiden Restriktionsenzyme BamHI und KpnI eingesetzt. Dabei handelt es sich um Typ-II-Restriktionsendonukleasen, welche die DNA innerhalb oder nahe der Erkennungssequenz (5'-GGATCC-3' und 3'-CCTAGG-5') unter Bildung eines 5'-Überhangs (5'-G GATCC-3' und 3'-CCTAG G-5') schneiden.

Digestions-Ansatz:

<u>pND14/DSG1</u>	<u>pcDNA3.1/V5-His-NC16a</u>
2µl Multicore Pufferlsg.	2µl Multicore Pufferlsg.
2µl BSA (1:10)	2µl BSA (1:10)
1µl pND14/DSG1	10µl pcDNA3.1/V5-His-NC16a
1µl KpnI	1µl KpnI
1µl BamHI	1µl BamHI
13µl H ₂ O	4µl H ₂ O

Die Ansätze wurden dann für drei Stunden bei 37 °C inkubiert.

3.2.3.2.1.6 Gelelektrophorese & Gel-Extraktion von pND14/DSG1

Das aufgeschlossene pND14/DSG1 Plasmid wurde elektrophoretisch aufgetrennt, um das Plasmid vom DSG1-DNA-Fragment zu isolieren. Wir verwendeten dazu den Hi-Mark-Ladder. Das 5kb Plasmid-Band wurde dann, wie in Punkt **3.2.3.2.1.3** und **3.2.3.2.1.4** beschrieben, aus dem Gel geschnitten und gereinigt.

3.2.3.2.2 Ligation in pND14 Plasmid

Für die Ligation des pND14 Plasmids mit dem NC16a-Fragment verwendeten wir eine T4-Ligase. Diese Ligase ermöglicht es DNA-Stränge durch die Ausbildung von Esterbindungen wieder zu einem ringförmigen Plasmid zu verknüpfen. Als Kofaktor benötigt das Enzym dazu ATP, welches im T4 Puffer bereitgestellt wurde.

Ligations-Anatz:

1µl T4 Pufferlsg.
4µl NC16a-Fragment
4µl pND14 Plasmid
0,5µl T4 Ligase
0,5µl H₂O

Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

3.2.3.2.3 Transformation in *E.coli*

2µl des Ligations-Mix wurden dann in ‚one Shot‘-*E.coli* wie in Punkt 3.2.3.1.1 beschrieben transformiert.

3.2.3.2.4 Anzucht der Bakterien

3.2.3.2.4.1 Auf Ampicillin Platten

Es wurden zwei Ampicillin-Platten wie in Punkt 3.2.3.1.2.1 beschrieben mit 50 bzw. 200µl *E.coli* beimpft.

3.2.3.2.4.2 In Luria-Basis Flüssigmedium

20 der auf den Ampicillin-Platten gewachsenen *E.coli*-Kolonien wurden separat in 2 ml Lb-carbenicillin – Medium über Nacht bei 37°C im Schüttler vermehrt.

3.2.3.2.5 PCR

Diese 20 Kolonien wurden dann wie in Punkt 3.2.3.1.3. beschrieben durch PCR vervielfältigt.

Vorwärts-Primer: 5'-GCGGGATCCGAGGAGGTGAGGGCG-3'

Rückwärts-Primer: 5'-CGGGGTACCGGCACAGTCGAGGCTGATCAGCGGG-3'

Das folgende Rezept und Thermocycler-Programm wurde für jede der 20 Kolonien verwendet:

Rezept:

2,5µl Coral Puffer Lsg.
 2µl DNTPs
 1µl 20nM Vorwärts-Primer
 1µl 20nM Rückwärts-Primer
 0,5µl Taq (HotStar-Polymerase)
 0,5µl Bakterien-Mix
 17,5µl H₂O

Thermocycler-Programm:

95°C	5 min	} 35x
95°C	30 sec	
67°C	30 sec	
72°C	45 sec	
72°C	10 min	
25°C	∞	

3.2.3.2.6 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde wie in Punkt **3.2.3.1.4** beschrieben durchgeführt. Das Gel wurde mit Klon # 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 geladen und mit der Größe eines standardisierten Markers (Hyper Ladder IV) verglichen.

3.2.3.2.7 Anzüchten zweier Klone in Lb-Medium

Inkubation von Klon # 1 und # 2 in zwei 10 ml Lb/Carbenicillin Röhren über Nacht bei 37 °C im Schüttler.

3.2.3.2.8 Reinigung der DNA

Die DNA wurde wie in Punkt **3.2.3.1.6** beschrieben gereinigt.

3.2.3.2.9 Messung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde wie in Punkt **3.2.3.1.7** beschrieben ermittelt.

3.2.3.2.10 Wiederholung der Digestion und Gelelektrophorese

Das Plasmid wurde ein weiteres Mal digestiert um zu beweisen, dass das richtige NC16a-Fragment inseriert wurde. Dazu wurden drei verschiedene Digestions-Ansätze für jeweils beide Klone vorbereitet:

- #1: 2µl Multicore Pufferlsg.
2µl BSA (1:10)
2µg pND14/NC16a (9,81µl für Klon #1 und 9.46µl für Klon #2)
1µl KpnI
H₂O (5,54 µl für Klon #1 und 5,19 µl für Klon #2)
- #2: 2µl Multicore Pufferlsg.
2µl BSA (1:10)
2µg pND14/NC16a (9,81µl für Klon #1 und 9.46µl für Klon #2)
1µl BamHI
H₂O (5,54 µl für Klon #1 und 5,19 µl für Klon #2)
- #3: 2µl Multicore Pufferlsg.
2µl BSA (1:10)
2µg pND14/NC16a (9,81µl für Klon #1 und 9.46µl für Klon #2)
1µl KpnI
1µl BamHI
H₂O (4,54 µl für Klon #1 und 4,19 µl für Klon #2)

Das Plasmid wurde pro 15µl Plasmid mit 2,5µl Orange Pufferlösung verdünnt.

Es wurden alle sechs Digestionsansätze in ein 2%iges Gel geladen und zusammen mit einem Hi-mark ladder im Gel aufgetrennt.

3.2.3.2.11 Sequenzierung

Wieder wurde die DNA zur Verifizierung der richtigen Sequenz in das Labor (MC labs, San Francisco, CA) geschickt.

3.2.4 Transfektion

Der Begriff ‚Transfektion‘ beschreibt in der Molekularbiologie das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellkulturzellen.

3.2.4.1 293T Zellen

Bei den 293T Zellen handelt es sich um eine Zelllinie von humanen embryonalen Nierenzellen. Dies sind hypotriploide Epithelzellen, welche adhärent wachsen und aufgrund ihrer einfachen Kultivier- und Transfizierbarkeit gerne in der Molekularbiologie eingesetzt werden.

3.2.4.1.1 293T Zellmedium

Folgendes Medium wurde zur Kultivierung von 293T Zellen empfohlen:

30 ml DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

10 ml GlutaMax (l-Glutamin)

5 ml Natrium Pyruvat

50 ml FBS hitzeinaktiviert (fetales Kalbsserum)

5 ml Pen/Strep

3.2.4.1.2 Auftauen & Anzichten der Zellen

Ein Röhrchen mit 5×10^6 293T Zellen wurde aus flüssigem Stickstoff entfernt und sofort in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Dann wurden die Zellen langsam in eine mit 14 ml 293T Zellmedium gefüllte T75-Zellkulturflasche getropft. Es wurde vorsichtig auf und ab pipettiert um die Zellen gleichmäßig im Medium zu verteilen. Die Zellen wurden dann bei 37 °C inkubiert. Nach einem Tag wurde das alte Medium entfernt und mit 15-25 ml frischen Medium ausgetauscht. Dieser Schritt wurde ein bis zweimal wiederholt, bis die Zellen zur Transfektion verwendet werden konnten.

3.2.4.2 Aufbringen der Zellen auf Slides

Die Zellkulturflaschen wurden aus dem Inkubator genommen und durch vorsichtiges Abgießen aus dem Zellmedium entfernt. Danach wurden die Zellen mit 10 – 14 ml steriler 1x PBS-Lösung gewaschen, wobei nicht direkt auf die Zellen pipettiert wurde, um deren Ablösung zu verhindern. Es wurde 1,5-2 ml Trypsin-versene hinzugefügt und die Zellkulturflasche für etwa zehn Minuten zurück in den Inkubator verbracht, bis sich die

Zellen von der Flaschenoberfläche gelöst haben. Danach wurden etwa 10 ml 293T Zellmedium hinzugegeben und die Zellen in eine Pipette aspiriert. Um große Zellklumpen zu vermeiden, filterte man die Zellsuspension durch ein Sieb. Man überführte 10µl der Zellsuspension zusammen mit 90µl Tryptan Blue Lsg. in eine Zählkammer (Hemocytometer) und zählte die Anzahl der Zellen. Die Anzahl der Zellen errechnete sich folgendermaßen:

Anzahl der Zellen pro Quadratmillimeter x Verdünnung (hier: x 10) x 10

Da ein Kubikmillimeter einem Mikroliter entspricht, kann man so die Menge an 293T Medium errechnen, mit der die Zellsuspension verdünnt werden muß, um 10^5 Zellen pro ml Medium zu erhalten. Von der verdünnten Zellsuspension pipettierte man 200 µl in die Kultivierkammern sogenannter ‚Chamber slides‘ und inkubierte sie für 24 Stunden bei 37 °C.

3.2.4.3 Transfektion der Zellen

Transfektion beschreibt den Vorgang, Fremd-DNA in eukaryotische Zellen einzuschleusen. Weiter kann man zwischen einer transienten und einer stabilen Transfektion unterscheiden. Bei der transienten Transfektion verbringt man nur für eine kurze Zeit ein Plasmid mit Fremd-DNA in eine Zelle, welches dann relativ rasch abgebaut wird. Die stabile Transfektion hingegen baut die DNA in das Genom der Zelle ein und verhindert deren Abbau. Es gibt eine Vielzahl von chemischen, physikalischen und biologischen Verfahren, Fremd-DNA in die Zelle zu bringen. Die herkömmlichsten sind unter anderem die Calcium-Phosphat-Präzipitation, die Elektroporation oder das Nutzen von viralen Vektoren. In unserem Projekt verwendeten wir das Verfahren der Lipofektion. Hier wurde die DNA mit Hilfe von Liposomen, durch deren Verschmelzung mit der Zellmembran, in die Zelle verbracht. Dazu verwendeten wir das Fugene 6 Reagenz, ein auf Lipiden basierendes Transfektions-Reagenz, welches mit der Zelle verschmilzt und die DNA somit ins Zellinnere transportiert. Dank seiner einfachen Handhabung, hohen Transfektionseffizienz in den meisten Zelltypen und dem geringen zytotoxischen Effekt, wird es gerne und häufig in der Molekularbiologie verwendet.

3.2.4.3.1 Durchführung

Sowohl Fugene 6 als auch Optimem-Medium sollten vor Beginn der Transfektion auf Raumtemperatur gebracht werden. Für die Transfektion von vier Zellkammern wurden 146 µl Optimem-Medium in polysteriles 5 ml Röhrchen gefüllt. Dann wurden 4,5 µl des Fugene 6 Reagenz direkt in das Medium pipettiert, ohne dabei die Wand des Röhrchens zu berühren. Diese Mischung wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 2 µg DNA hinzugefügt werden, und das Röhrchen kurz vorsichtig geschüttelt und für 15-30 Minuten wieder bei Raumtemperatur gelagert wurde. Von dieser Mischung wurden jeweils 30 µl in das Zellmedium gegeben und tröpfchenweise über die gesamte Zellkammer gleichmäßig verteilt. Danach wurde das Chamber Slide für weitere 48 Stunden bei 37 °C inkubiert.

3.2.5 Indirekter Immunfluoreszenztest an transfizierten Zellen

Die Zellen wurden als Substrat für den indirekten Immunfluoreszenztest verwendet. Um eine Membrandurchlässigkeit zu erreichen, wurden die Zellen sofort nach Entfernen des Mediums, in 4° C kaltem Methanol für vier Minuten fixiert. Durch das Blocken mit 10%igem fetalem Kalbsserum bzw. 1%igem Kaninchenserum für die Zellen, bei denen gegen V5 getestet wurde, wurde eine Anlagerung unspezifischer Antikörper gehemmt. Danach wurde jeweils ein Kammerpaar (eine Kammer mit transfizierten und eine Kammer mit nicht transfizierten Zellen) mit 200 µl des jeweiligen primären Antikörpers, in PBS verdünnt, für eine Stunde inkubiert. Nach zehn-minütigem Waschen in PBS wurde der passende sekundäre Antikörper auf die jeweiligen Zellen pipettiert und für 30 Minuten in den Kammern belassen. Nach einem weiteren zehn-minütigen Waschen in PBS wurden die Kammern vom Objektträger entfernt und dieser wurde für 40 Sekunden in eine Lösung von 100 ml PBS mit zwei Tropfen Evans Blue eingetaucht. Nach weiterem 60 minütigen Waschen in PBS auf einem Schüttler, wurden die Zellen mit Vectashield/Dapi beschichtet und ein Deckglas angebracht, bevor man die Zellen unter einem Epifluoreszenz-Mikroskop evaluierte. Als Positivkontrolle wurde pro getesteten Objektträger jeweils ein Kammerpaar mit einem Maus-anti-V5-Antikörper getestet.

IV. Ergebnisse

4.1 Immunfluoreszenztest an Salzspalthaut

Alle uns vorhandenen BP- und MMP-Sera wurden als erstes durch einen indirekten Immunfluoreszenztest an normaler caniner Salzspalthaut, wie es in Punkt **3.2.1.2** beschrieben wurde, getestet.

Die Ergebnisse dieses Tests dienen zum einen der Verifizierung vorhandener Autoantikörper und der Ermittlung des jeweiligen Antikörper-Titers, zum anderen sollte sicher gestellt werden, dass die vorhandenen Autoantikörper an der epidermalen Seite des Spaltes binden. Eine Bindung an der epidermalen Seite, also am Blasendach, macht ein Vorhandensein von anti – BP180 bzw. anti-NC16a-Antikörpern sehr wahrscheinlich. Da bei MMP-Patienten neben Kollagen XVII noch andere Proteine wie Laminin-5 und Integrine Antigenstrukturen darstellen, sieht man häufig auch eine Bindung der Autoantikörper im dermalen Bereich der Salzspalthaut. In unserer Studie wurden deshalb nur solche MMP-Sera eingeschlossen, welche eine epidermale oder eine beidseitige Bindung aufwiesen und bei denen somit anti-NC16a-Antikörper wahrscheinlich waren.

Tabelle 3 zeigt die ermittelten Antikörper-Titer der jeweiligen Patienten, bis zu welchen eine Bindung der Antikörper an die passenden Antigenstrukturen durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden konnte. Einige Patienten wiesen einen Titer $< 1:10$ auf. Das bedeutet, dass das Serum bei einer 1:10 Verdünnung mit PBS keine sichtbare Antikörperbindung zeigte. Da eine geringere Verdünnung zu einer unspezifischen Bindung und damit zu falsch positiven Resultaten führen kann, wurden diese nicht als positiv bezeichnet. Sie sollten dennoch zum späteren Test an transfizierten 293T-Zellen herangenommen werden und sind deshalb in die Tabelle integriert worden.

4.2 DNA-Gewinnung zur Herstellung des NC16a-Fragments

4.2.1 RNA Gewinnung und Konzentrationsbestimmung

Die RNA wurde aus Keratinozyten des Lippengewebes eines Hundes extrahiert (siehe Punkt **3.2.2.1**). Um zu prüfen, ob die Menge und Qualität der gewonnenen RNA zufriedenstellend war, wurde diese quantitativ mittels UV-Spektroskopie bestimmt. Dabei absorbieren die stickstoffhaltigen Basen der Nukleinsäure UV-Licht bei einer Wellenlänge von 260nm. Diese Absorption ist direkt proportional zur Nukleinsäurekonzentration. Bis zu einer Absorption von zwei ist der Zusammenhang zwischen Konzentration und Absorption linear.

Folgende Gleichung lässt die Konzentration berechnen:

$$\text{Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = A_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

Wir erhielten 30 μ l RNA, deren Konzentration bei 100 ng/ μ l lag.

Mit der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 lässt sich Protein in der Nukleinsäure nachweisen, da Tryptophanreste Licht bei dieser Wellenlänge absorbieren. So lässt sich mit Hilfe des Quotienten $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ der Verunreinigungsgrad der Nukleinsäure bestimmen. Bei reiner RNA liegt das $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ Verhältnis zwischen 1,8-2,0 (Stephenson 2005). Da unser Quotient bei 1,95 lag, wurde nicht von einer Kontamination der RNA ausgegangen.

4.2.2 PCR

Es wurden die, wie in Punkt **3.2.2.4.1** beschrieben, passenden Primer hergestellt und dann eine PCR zur Vervielfältigung des NC16a-Amplifikons durchgeführt (siehe Punkt **3.2.2.4.2**). Das PCR-Produkt wurde auf einem 2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Punkt **3.2.2.5.1**). Das 231 bp große NC16a-Fragment konnte mit Hilfe eines Standard-Markers (100bp Promega) ermittelt werden, und wurde aus dem Gel geschnitten und extrahiert.

4.3 Klonierung

Das gewonnene NC16a-Fragment sollte zunächst kloniert und dann später rekombinant exprimiert werden. Als Expressionsvektor diente im ersten Schritt das kommerziell erhältliche pcDNA 3.1/V5 His TOPO Plasmid und später das von Dr. Gray Rhodes (University of California Davis, Davis, Californien) bereitgestellte pND14 Plasmid.

4.3.1 Vektor: pcDNA 3.1/V5-HIS-TOPO Plasmid

Zur heterologen Expression von NC16a in eukaryoten Zellen wurde die cDNA in Expressionsvektoren kloniert, die auf den Vektor pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe) basierten (vgl. Abb.14). Der prokaryotische Replikationsursprung (pUC) garantiert eine effiziente Klonierung. Der in diesem Vektor enthaltene starke Promotor des Zytomegalievirus (CMV) und das Polyadenylierungssignal aus bovinem Wachstumshormon kontrollieren die Transkription des transfizierten Gens und bewirken die Überexpression der cDNA in Eukaryonten. Der Vektor ist in einer linearisierten Form (pcDNA3.1/V5-His-TOPO) verfügbar, in der die 3'-Enden jeweils ein Desoxythymidin als Überhang besitzen (siehe Abb.14), an das über das 3'-Phosphat das Enzym Topoisomerase I kovalent gebunden ist. Die Topoisomerase und die Thymidin-Überhänge verhindern eine Religation des leeren Vektors und ermöglichen eine Subklonierung von PCR-Produkten, die einen 3'-Desoxyadenosin-Überhang besitzen, ohne Verwendung einer weiteren Ligase.

Im Vektorrückrad befindet sich das Ampicillinresistenzgen zur prokaryotischen Selektion sowie das Neomycinresistenzgen für die eukaryotische Selektion. Für eine gute Expression der Neomycinresistenz sind SV40-Promotor und Polyadenylierungssignal (SV40 ori; SV40 pA) verantwortlich. Die multiple cloning site (MCS), welche die Erkennungssequenzen für vielerlei Restriktionsenzyme besitzt, ist linearisiert. Hier ist vor allem die C-terminale Markierung mit dem V5-Epitop und dem Polyhistidinpatch (His6) hervorzuheben.

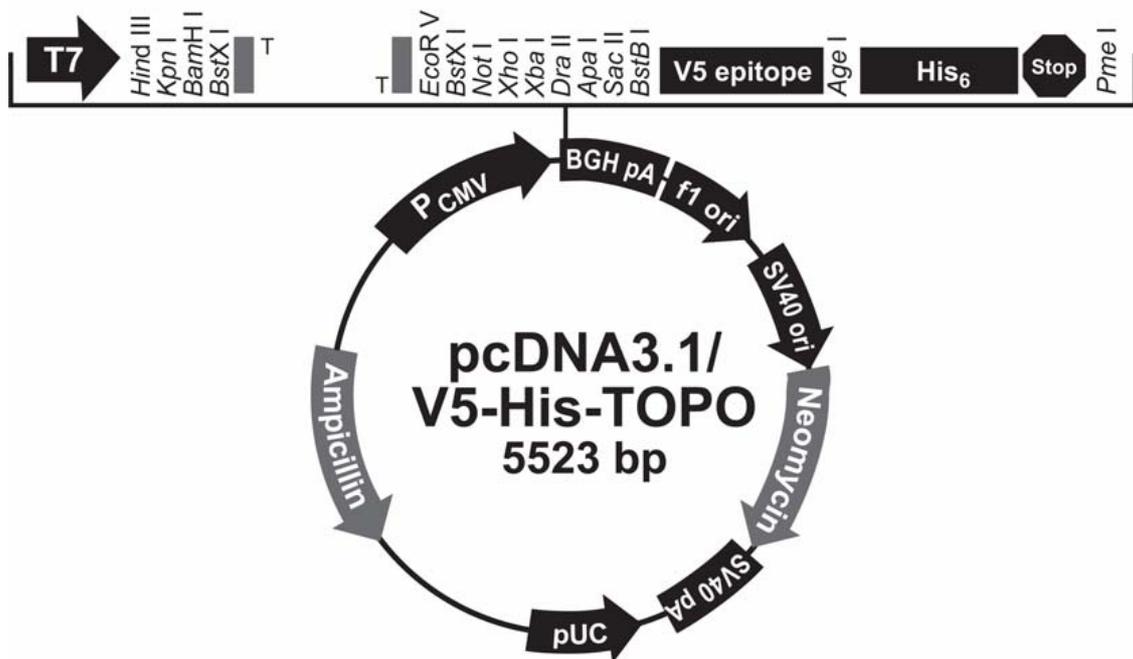


Abb. 14: pcDNA3.1/V5-HIS-TOPO, Quelle:www.invitrogen.com.

Das Plasmid wurde anschließend in *E.coli* transformiert (Punkt 3.2.3.1.1) und auf Ampicillin-haltigem Nährboden kultiviert. Durch das Ampicillin-Resistenzgen kommt es zur Selektion von Bakterienklonen, die den Vektor mit dem PCR-Fragment enthalten. Es wurden Bakterienklone ausgewählt und in Flüssigmedium kultiviert und anschließend wurde eine PCR durchgeführt (Punkt 3.2.3.1.3). Dabei wurde anstelle von reiner DNA jeweils 1µl des Bakterienmixes hinzugefügt. Zur Verifizierung des korrekten Amplifikons wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Abb. 15 zeigt die Ergebnisse dieser Gelelektrophorese. Es wurden acht bzw. zehn Bakterienklone getestet, wobei zwei verschiedene DNA-Polymerasen in der PCR verwendet wurden. Die obere Hälfte von Abb. 15 zeigt Klon # 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 (verwendete DNA-Polymerase - Hotstar von Quiagen). Hier kann man mit Hilfe des Standards (erste Reihe) bei Klon # 2,4,5,7,9 deutlich das vorhandene 231bp große DNA-Fragment ermitteln. GAPDH, ein „housekeeping Gen“, wurde als Positivkontrolle verwendet.

Die untere Hälfte von Abb. 15 zeigt die getesteten Klone, welche mit der anderen DNA-Polymerase (HIFI von Roche) in der PCR amplifiziert wurden. Zusätzlich zu den acht Klonen die bereits oben besprochen wurden, wurde noch Klon # 3 und # 10 getestet.

Klon # 2, 3, 4, 9, 10 scheinen, wenn man die Banden mit dem Standard vergleicht (erste Reihe), das 231bp große gesuchte Fragment (siehe Pfeil) inkorporiert zu haben. Nach weiterer erfolgreicher PCR und Gelelektrophorese von Klon # 2 und 10 (vgl. Abb. 16) wurde die DNA aus den Bakterien extrahiert und zur Sequenzierung in ein kalifornisches Labor geschickt.

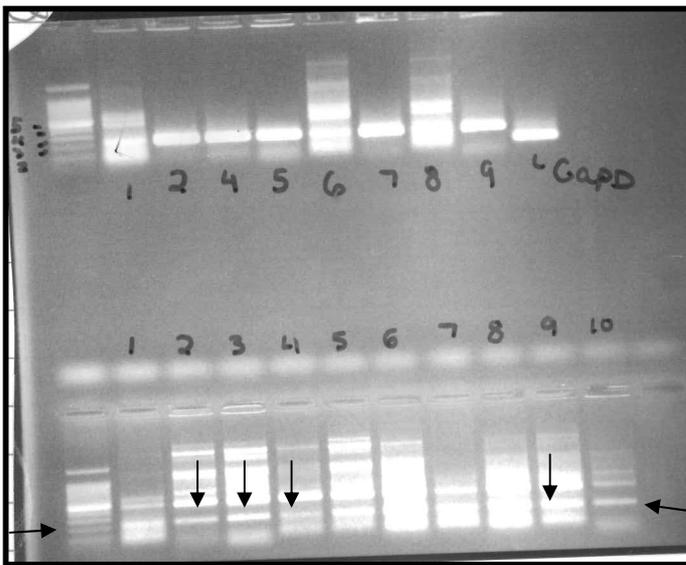


Abb. 15: Gelelektrophorese:
 Ø obere Hälfte: Screening von 8 Bakterienklonen, GAPDH dient als Positivkontrolle, Klon #2, 4,5,7,9 scheinen das 231bp große Fragment zu enthalten. DNA-Polymerase – Hotstar (Quiagen)
 Ø untere Hälfte: Screening der gleichen Bakterienklone, zusätzlich noch Klon #10 und #3. Hier wurde eine andere DNA-Polymerase verwendet (HIFI-Roche). Hier scheinen #2, 3, 4, 9, 10 eindeutig das 231 bp große Fragment inkorporiert zu haben (Pfeile).

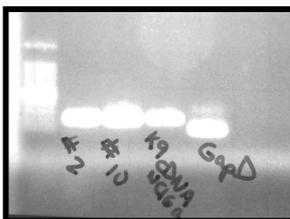


Abb. 16: Wiederholung der Gelelektrophorese. Verifizierung, dass Klon #2 und #10 das korrekte 231bp große DNA-Fragment inserieren. GAPDH und das aus caniner cDNA amplifizierte NC16a-Fragment dienen als Positivkontrolle.

Das eingeschickte DNA-Fragment enthielt die veröffentlichte canine NC16a-Sequenz (siehe Abb. 17).

```
1563-1793 /gene="BP180"/note=" encodes non-collagenous extracellular
domain(NC16A) "
```

```
1561 ctgaggaggt gagggcgctg aaggcacggg tggcagagct ggagcagagc cggagcaacg
1621 tgctgctttt caaggaggag atgcaacggg ccaacaagga ctggctgcag ggggaagcgc
1681 ccagcgtgga agcaggggag gccaaactag ggcttgacgg ccaccagcag gaggagctct
1741 ggctgttcgt gaggaacagg ttgatggccg agcaagaaaa cggaaatctc cgaggaagcc
1801 ctggccctaa
```

Abb. 17: Übereinstimmung der in der DNA enthaltenen NC16a- und der veröffentlichten caninen NC16a-Sequenz (Genbank accession- #: AF016649).

4.3.2 Vektor: pND14-Plasmid

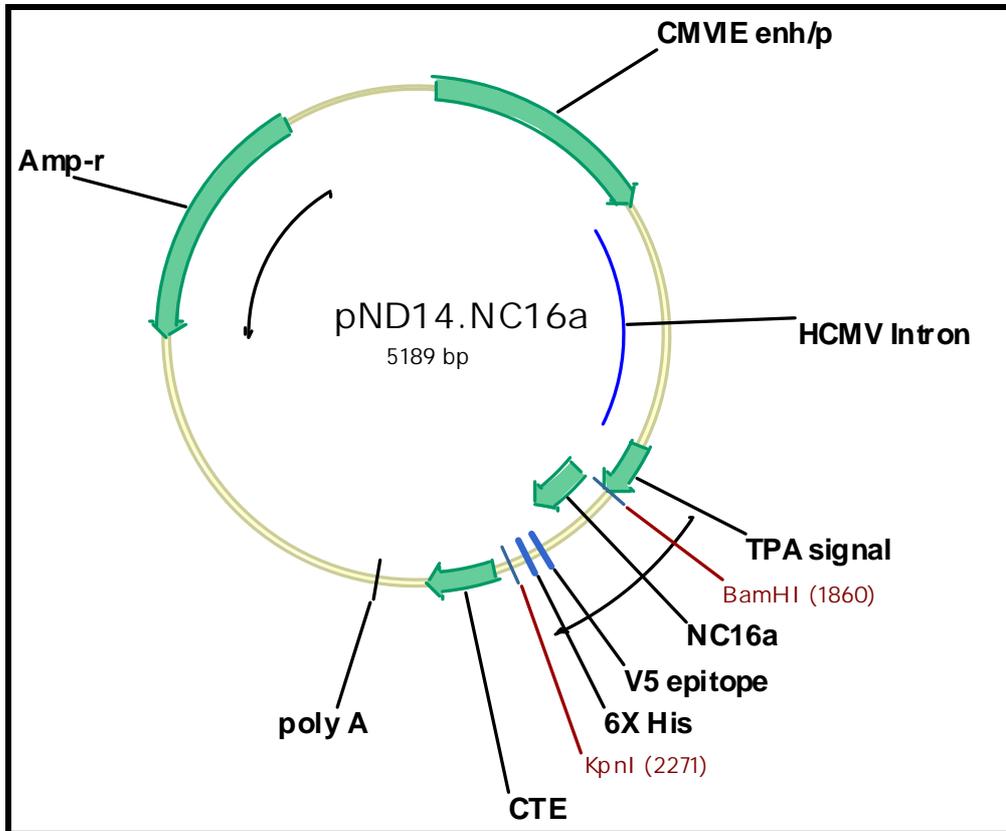


Abb. 18: pND14-Plasmid

CMVIE	„cytomegalovirus immediate early enhancer/promoter/intron A“
CTE	„simian retrovirus transport element“
Poly A	„bovine growth hormone poly A domain“
Amp-r	„ampicillin resistance gene (β -lactamase)“
HIS	„polyhistidine tag“
TPA	„tissue plasminogen activator“
V5	„V5-Protein“
HCMV	„human cytomegalovirus“

pcDNA3.1/V5-HIS-NC16a wurde ein weiteres Mal durch PCR amplifiziert. Dieses Mal wurden Primer verwendet, welche die 5'-BamHI und 3'-KpnI Restriktionsseiten besitzen:

Vorwärts-Primer: 5'-GCGGGATCCGAGGAGGTGAGGGCG-3'

Rückwärts-Primer: 5'-CGGGGTACCGGCACAGTCGAGGCTGATCAGCGGG-3'

Die unterstrichenen Teile stellen jeweils die Restriktionsseiten dar. Diese Primer wurden so hergestellt, um zusätzlich die V5 und 6-HIS(tidine) Seite zu koamplifizieren. Die PCR-Produkte wurden mit BamHI und KpnI aufgeschlossen und anschließend in ein pND14 Plasmid ligiert.

Das pND14 wurde von Dr. Gray Rhodes (University of California Davis, Davis, Californien) kostenlos zur Verfügung gestellt. In Abb. 18 ist dieses Plasmid dargestellt. Wie pcDNA3.1/V5-HIS-NC16a enthält es ebenfalls das humane Zytomegalie-Virus (HCMV) und das Polyadenylierungssignal aus bovinem Wachstumshormon, welche die Transkription des transfizierten Gens kontrollieren und die Überexpression der cDNA in Eukaryonten bewirken. Es besitzt zusätzlich einen Gewebsplasminogen-Aktivator (TPA) offenen Leserahmen und ein vom Simianvirus stammendes Transportelement, welches die ungespaltene RNA aus dem Nukleus ins Cytoplasma transportiert (Braun, Rohrbach et al. 1999).

Nach gelungener Transformation des Plasmids in *E.coli* Bakterien, wurden diese auf Ampicillin Platten und später in Luria-Base Medium angezüchtet. Wie oben beschrieben wurde die DNA dann durch PCR amplifiziert und mit einer Gelelektrophorese die richtige Größe des Amplifikons kontrolliert. Abb. 19 zeigt das Gelelektrophorese-Ergebnis der gescreenten Kolonien. Anhand eines Standards (Hyper Ladder IV) konnte deren Größe ermittelt und positive Kolonien ein weiteres Mal angezüchtet sowie zur Kontrolle digestiert werden (vgl. Abb. 20).

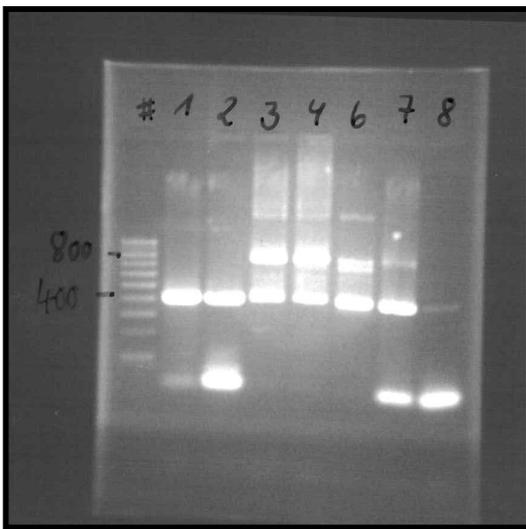


Abb.19: Screening von 7 Kolonien. # 1, 2, 3, 4, 6, 7 zeigen ein 400bp grosses Fragment. Anzuchtung von #1 und #2 in Lb-Medium.

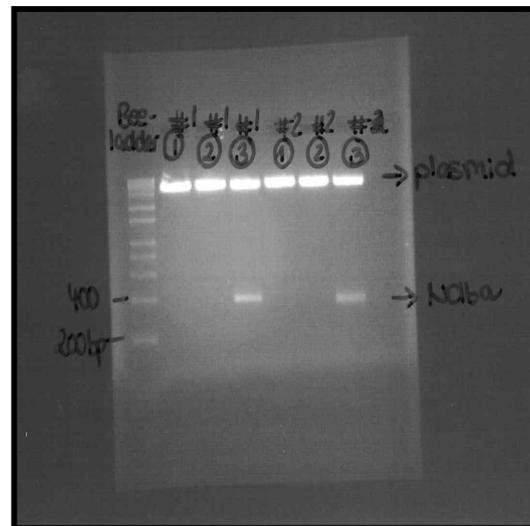


Abb. 20: Digestion der Kolonien #1 und #2. Für beide Kolonien wurden drei Digestionsansätze verwenden (siehe 3.2.4.10). Digestionsansatz #3 weist ein von der Größe passendes DNA-Fragment nach.

Auch bei diesem Plasmid waren die Ergebnisse der Sequenzierung identisch mit der veröffentlichten Sequenz des caninen Genoms (vgl. Abb. 17).

4.4 Transfektion

Das pND14-NC16a-Plasmid wurde benutzt, um humane Zellen zu transfizieren (vgl. Punkt 3.2.4). Es wurden dazu 293T Zellen verwendet, wobei es sich um humane embryonale Nierenzellen (HEK- human embryonal kidney cells) handelt. Diese Zellen sind extrem einfach in der Kultivierung und Transfektion, wachsen schnell, haften fest an Kunststoffoberflächen an und werden deshalb gerne in der Molekularbiologie eingesetzt. Das T im Namen der Zellen steht für das T-Antigen des SV40 Virus (Simian virus 40). 293T Zellen enthalten dieses Antigen und erlauben so die Replikation von transfizierten Plasmiden, die ein „SV40 origin of replication“ besitzen.

Die Zellen wurden mit dem Reagenz „Fugene6“ nach dem Prinzip der Lipofektion transfiziert. Dank seiner geringen Zytotoxizität und einfachen, schnellen Handhabung wird es gerne in der Molekularbiologie eingesetzt.

4.5 Indirekter Immunfluoreszenztest an transfizierten Zellen

Wie in Punkt 3.2.5 beschrieben, dienten die mit NC16a transfizierten Zellen als Substrat für den indirekten Immunfluoreszenztest. Dafür wurden alle caninen BP- und MMP-Sera, welche bereits an normaler caniner Salzsalthaut getestet wurden, nochmals an den transfizierten Zellen getestet. Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte 293T-Zellen verwendet.

Es wurde zunächst mit denselben Verdünnungsternern getestet, bis zu welchen eine Antikörperbindung an normaler Salzsalthaut durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden konnte (vgl. Tabelle 5). Nachdem diese Verdünnungen keine positiven Ergebnisse zeigten, wurde dann mit halber Verdünnung und nach weiterhin ausbleibenden positiven Ergebnissen mit einer Verdünnung von 1:2 getestet. Auch bei dieser Verdünnung zeigten die Zellen keinerlei Fluoreszenz (vgl. Abb. 23). Da keines der Seren positive Reaktionen mit den Zellen zeigte, wurde nach möglichen Erklärungen gesucht. Eine Erklärung wäre, dass das NC16a-Protein nicht korrekt von den Zellen exprimiert wird, die andere, dass das korrekt exprimierte NC16a nicht von den im Serum vorhandenen Antikörpern erkannt wird. Um das erstere auszuschließen, wurde deshalb zum Nachweis des korrekt exprimierten NC16a Proteins mit einem Kaninchen anti-humanem-NC16a-Antikörper Serum getestet.

Bevor es allerdings an transfizierten Zellen getestet wurde, wurde ein IIF an normaler Salzsalthaut in einer Verdünnung von 1:10 mit diesem Antikörper-Serum durchgeführt. Damit sollte getestet werden, ob Antikörper, die gegen das humane NC16a gerichtet sind, an das canine NC16a binden. Abb. 21 zeigt links im Bild eine deutliche, durch Fluoreszenz sichtbar gemachte, epidermale Antikörperbindung, wohingegen das Kontrollserum (normales Kaninchenserum, 1:10) keine Antikörperbindung zeigt und somit eine unspezifische Bindung der Antikörper ausschließt.

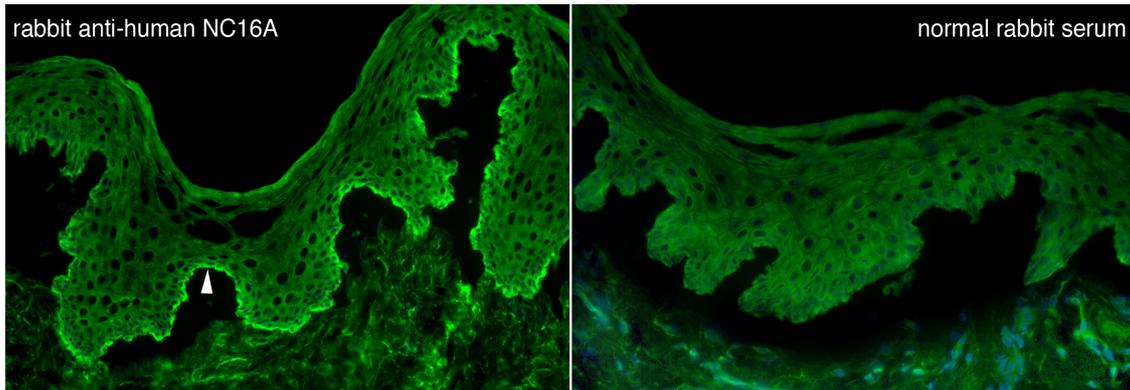


Abb. 21: IIF an normaler Salzspalthaut: Im linken Bild sieht man die deutliche Bindung der Kaninchen anti-humanen-NC16a-Antikörper an der epidermalen Seite des Spaltes (Verdünnung 1:10). Rechts wurde normales Kaninchenserum zum Ausschluß einer unspezifischen Antikörperbindung getestet.

Durch den Test des anti-humanen-NC16a Kaninchenserums an normaler Salzspalthaut wurde eine Bindung an das an der epidermalen Seite des Blasenspaltes liegendem NC16a-Antigen nachgewiesen.

Dieses Serum wurde im zweiten Schritt an den transfizierten Zellen im IIF getestet. Auch hier kam es zur Bindung der im Serum vorhandenen Antikörper an das NC16a-Fragment und zur sichtbaren Fluoreszenz der Zellen (vgl. Abb. 22). Das Serum zeigte hier jedoch einen höheren Antikörper-Titer. Die Zellen zeigten Fluoreszenz bis zu einer Verdünnung des Serums von 1:100 in PBS. Das Vorhandensein und die korrekte Expression des NC16a-Proteins konnte so bewiesen werden.

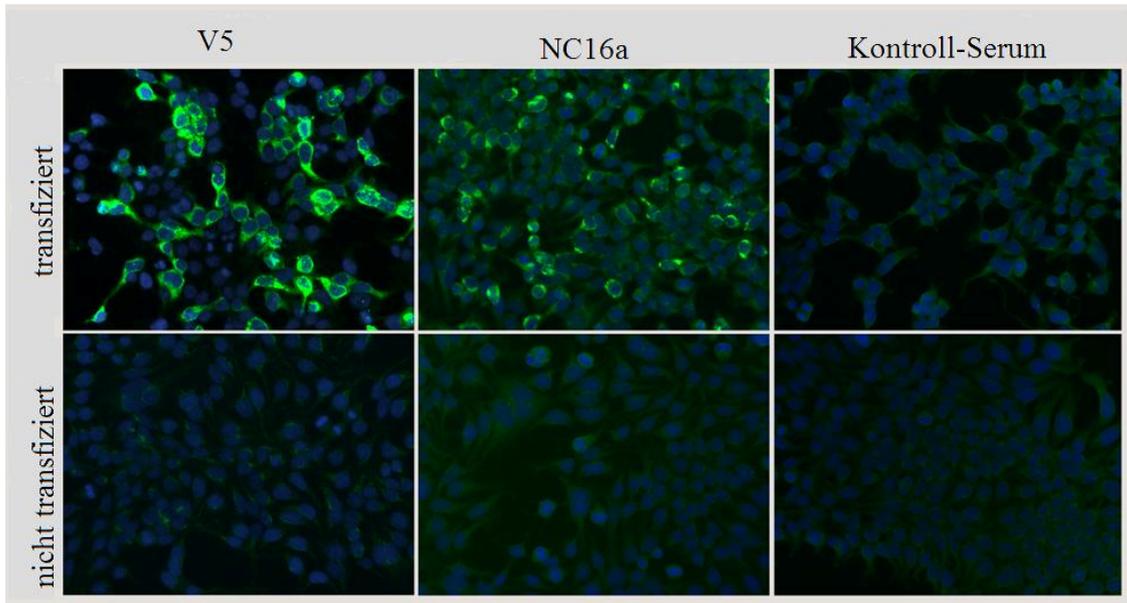


Abb. 22: IIF an transfizierten und nicht transfizierten Zellen:

Die positive V5-Antikörper Reaktion beweist die korrekte Transfektion und das Vorhandensein des Plasmids in den transfizierten Zellen. Die positive Reaktion der transfizierten Zellen mit dem anti-humanem-NC16a Kaninchenserum beweist die korrekte Expression des NC16a-Fragments. Als Negativ-Kontrolle diente der Test an nicht transfizierten Zellen. Hier konnte weder bei V5, NC16a noch bei den Kontrollseren eine positive Reaktion festgestellt werden.

Zum Ausschluß falsch positiver Ergebnisse durch unspezifische Antikörper-Anlagerungen wurden für jedes getestete Serum zusätzlich auch an nicht transfizierten Zellen in genau gleicher Konzentration der Antikörper getestet. Außerdem wurde pro getestetem Kammerobjektträger (vier Kammern transfizierte und vier Kammern nicht transfizierte Zellen) ein Kammerpaar (jeweils eine Kammer mit transfizierten und eine Kammer mit nicht transfizierten Zellen) mit einem V5-Antikörper getestet. Dabei handelt es sich um einen monoklonalen Maus IgG Antikörper, welcher gegen das V5-Epitop gerichtet ist. Damit weist dieser Antikörper rekombinante Proteine nach, die das V5 Epitope enthalten, indem folgende Aminosäuresequenz entdeckt wird: **Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr**. Der V5 Antikörper sollte in unserem Fall ein Nachweis für eine gelungene Transfektion des Plasmids und einen korrekt durchgeführten IIF darstellen.

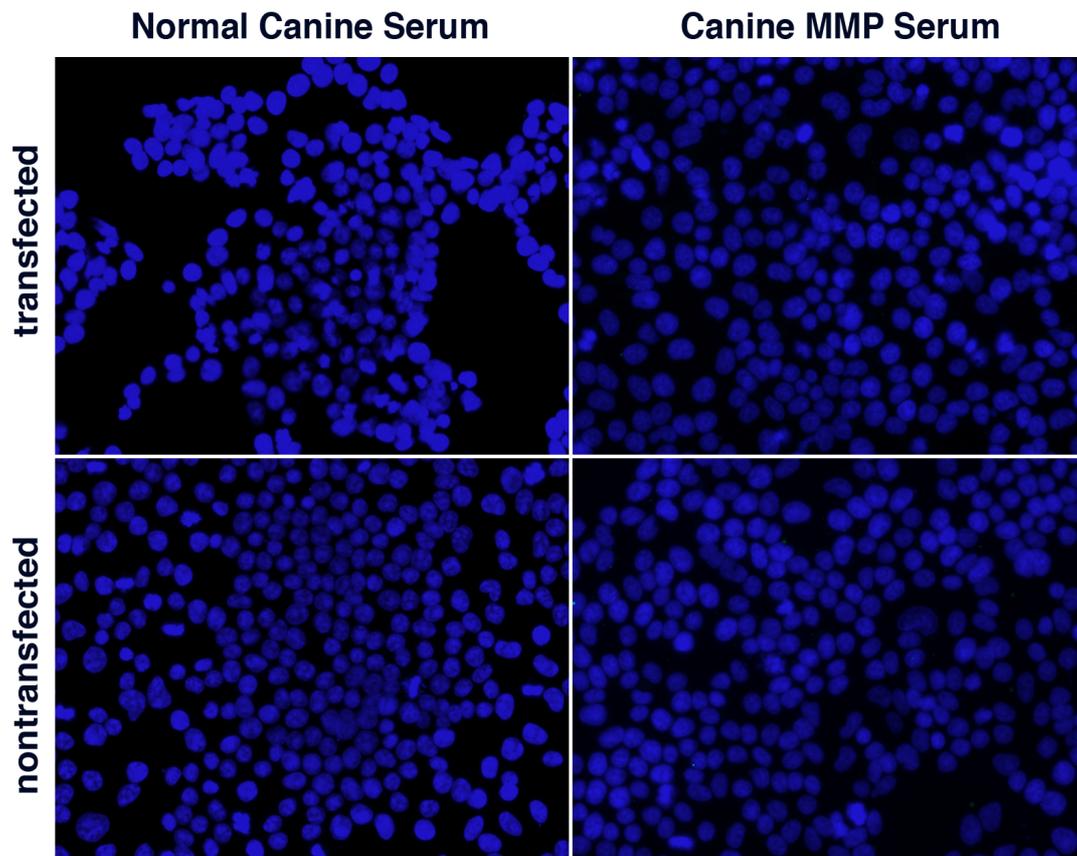


Abb. 23: IIF an transfizierten Zellen: Sowohl das Kontrollserum wie auch das MMP-Serum zeigen weder an transfizierten noch an nicht transfizierten Zellen Fluoreszenz.

V. Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch den IIF an Salzsalthaut wurden Autoantikörper im Serum der Patienten nachgewiesen. Deren Bindung an der epidermalen Seite des Spaltes machte ein Vorhandensein von anti-BP180 bzw. anti-NC16a-Antikörpern wahrscheinlich. Die Amplifizierung des NC16a-Fragments und die korrekte Klonierung in beide Plasmide wurde durch die Sequenzierung der DNA überprüft. In beiden Fällen stimmte die ermittelte Sequenz des DNA-Fragments mit der veröffentlichten Sequenz des caninen Genoms überein.

Die Transfektion der 293T Zellen mit dem pND14.NC16a-Plasmids konnte mit Hilfe der positiven V5-Reaktion bestätigt werden.

Da es keine Bindung der in den Patientenseren vorhandenen Autoantikörper an das rekombinant exprimierte NC16a-Protein gab, wurde die korrekte Expression des Proteins angezweifelt.

Daraufhin bestätigte ein positiver IIF mit einem Kaninchen anti-humanem NC16a-Antikörper-Serum das Vorhandensein und die korrekte Expression des NC16a-Fragments in den transfizierten Zellen. Dieses Serum wurde zuvor bereits an caniner Salzsalthaut im IIF getestet, um eine Bindung der Antikörper, welche gegen das humane NC16a gerichtet waren, an das canine NC16a zu beweisen.

Somit konnte die korrekte Expression des Proteins nachgewiesen und methodische Fehler weitgehend ausgeschlossen werden. Damit wurde der hier untersuchte Teil des BP180 Proteins, nämlich die NC16a-Region, von den im Patientenserum vorhandenen Autoantikörpern nicht detektiert und scheint für die Pathogenese von BP und MMP nicht relevant zu sein.

5.2 NC16a als Zielantigen von BP/MMP Autoantikörpern

Die Zellen, welche als Substrat für den IIF dienen sollten, wurden mit einem Plasmid, das die canine NC16a-Sequenz enthielt, transfiziert. Wie bereits in Abschnitt I beschrieben, wurden 35 der neuesten Studien aus dem Bereich der Humanmedizin (siehe Tabelle 6, Anhang 9.5) ausgewertet, welche sich mit der Antigenität von NC16a bei der BP- und

MMP-Pathogenese beschäftigten. Demnach bindet der Grossteil aller BP-Autoantikörper (82,52 %) und viele MMP-Autoantikörper (42,5 %) beim Menschen an die NC16a-Struktur des BP180. Man fand heraus, dass sich die antigenen Strukturen vor allem im Bereich der letzten 45 Aminosäuren am N-terminalen Ende der NC16a-Region befinden (Zillikens, Rose et al. 1997). Von dieser Tatsache ging man auch beim caninen BP und MMP aus. Xu et al. (Xu, O'Toole et al. 2000) zeigten, dass Antikörper von caninen BP-Patienten an Epitope des humanen NC16a-Epitopes binden. Daraus folgerten sie, dass die Antigenstrukturen, welche von den Autoantikörpern bei BP erkannt werden, bei Hunden und Menschen identisch sein müssen und damit auch beim Hund in der NC16a-Region liegen.

Aufgrund dieser Ergebnisse, entschieden wir uns lediglich die canine NC16a-Region des BP180 zu klonen und in die Zellen zu transfizieren. Außerdem versprachen wir uns durch die erheblich geringere Größe des NC16a-Fragments im Vergleich zum gesamten BP180-Protein ein einfacheres und schnelleres Klonen und Transfizieren und damit eine exaktere und fehlerfreiere Expression des Proteins.

5.3 Erörterung möglicher Fehler

Wie bereits in Punkt 4.5 erläutert, erbrachte der indirekte Immunfluoreszenztest an den mit NC16a transfizierten Zellen keine positiven Ergebnisse.

Die Erklärungen dafür sollen im Folgenden diskutiert werden:

5.3.1 Fehlen von Autoantikörpern

Ein Grund weshalb der Test zu keinen positiven Ergebnissen führte, könnte das Fehlen von Autoantikörpern in den getesteten Seren darstellen. Da aber alle hier verwendeten Seren zuvor an normaler caniner Salz-Spalthaut im IIF getestet wurden und eine Antigen-Antikörper-Bindung durch Fluoreszenz bewiesen wurde, kann diese Möglichkeit weitgehend ausgeschlossen werden.

5.3.2 Fehlerhafte Methodik

Eine fehlerhafte Methodik kann durch den Nachweis des korrekt exprimierten NC16a-Proteins durch einen positiven IIF an Salzspalthaut mit einem Kaninchen anti-NC16a-

Antikörper Serum mit größter Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden (vgl. Punkt 4.4). Des Weiteren zeigte eine positive V5-Reaktion eine erfolgreiche Transfektion und einen richtig durchgeführten IIF an.

5.3.3 Geringe Test-Sensitivität

Als eine weitere Erklärung für das Ausbleiben positiver Ergebnisse beim IIF an den transfizierten Zellen kann eine geringe Sensitivität dieses Tests angesehen werden. So könnten zwar Antikörper im Serum vorhanden sein, NC16a jedoch als Antigenstruktur nicht ausreichend von den Antikörpern erkannt werden. Diese Theorie kann allerdings durch die Tatsache widerlegt werden, dass das NC16a-Protein von Antikörpern des Kaninchen anti-NC16a-Serums noch bei einer Verdünnung des Serums von 1:100 in PBS erkannt wurde, wohingegen ein IIF an caniner Salzpalthaut mit diesem Serum lediglich bis zu einer Verdünnung von 1:10 eine Fluoreszenzbindung zeigte. Demnach kann der indirekte Immunfluoreszenztest durchgeführt an transfizierten Zellen als erheblich sensibler angesehen werden.

5.3.4 Expression eines nicht relevanten Proteins

Somit bleibt nur die Erklärung, dass zwar Antikörper im Serum der Patienten vorhanden waren, diese aber das korrekt exprimierte NC16a nicht erkannt haben. Die Bindung dieser Antikörper an Strukturen der Basalmembran, genauer an die epidermale Seite der Blase von Salzpalthaut, deutet darauf hin, dass diese Antikörper gegen das Kollagen XVII gerichtet sind. Wie in der Humanmedizin wird das Kollagen XVII auch in der Tiermedizin als das Hauptantigen in der BP- und MMP-Pathogenese angesehen. Bisher ging man auch davon aus, dass wie beim Menschen auch bei Hunden vor allem die NC16a-Region die Zielstruktur der Autoantikörper darstellt.

Wie bereits schon früher in dieser Arbeit besprochen, berichteten Xu et. al. (Xu, O'Toole et al. 2000) über das Klonen des caninen BP180 und das Immunomapping der NC16a-Region. Dabei fanden sie heraus, dass das humane und canine NC16a nur zu 58% identisch und zu 71% homolog sind. Allerdings zeigten sie auch, dass die von humanen BP-Antikörpern erkannten NC16a-Epitope auch von caninen BP Antikörper angegriffen

wurden und folgerten somit, dass die wichtigen antigenen Strukturen weitgehend identisch sein müssen.

Wie ist nun die Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen und den hier erläuterten Ergebnissen der besagten Studie zu erklären?

Es wurden in der von Xu et. al. durchgeführten Studie andere BP-Seren verwendet, welche uns leider nicht zur Verfügung standen. So könnte es durchaus sein, dass diese Seren anti-NC16a-Antikörper enthielten, unsere verwendeten Seren jedoch nicht. Auch Xu et. al. berichteten, dass nur zwei von drei getesteten Seren Reaktionen mit den untersuchten Epitopen zeigten. Diese Tatsache spräche dafür, dass eventuell nicht alle Seren anti-NC16a-Antikörper besitzen und nur bei manchen Seren die NC16a-Region als Antigenstruktur von BP- und MMP- Autoantikörpern erkannt wird.

Eine andere Erklärung könnte sein, dass in der von Xu et al. untersuchten Studie chemisch synthetisierte Peptide, welche die gesamte NC16a-Domäne enthielten, zum Test der Seren im ELISA verwendet wurden. In unserer Studie ließen wir das NC16a-Peptid von eukaryotischen Zellen rekombinant produzieren. Somit wird sicher gestellt, dass das Protein der natürlichen Expression vergleichbar produziert und dem Test in unveränderter Form zur Verfügung steht. Somit ist dieser Weg zwar aufwändiger in der Durchführung, aber dadurch weniger fehleranfällig und somit als verlässlicher einzuschätzen. Dies könnte ein Grund für falsch positive Ergebnisse in der Xu et al. Studie darstellen.

5.4 Schlußfolgerung

In dieser Arbeit wurde versucht ein neues Testsystem zum Nachweis von caninem BP und MMP zu entwerfen. Dabei sollten humane Nierenzellen mit NC16a transfiziert werden und später für immunhistochemische und immunserologische Untersuchungen zur Verfügung stehen.

Es gelang uns diese eukaryonten Zellen das canine NC16a produzieren zu lassen und dieses mit Hilfe eines Kanninchen anti-humanem NC16a-Antikörper Serum nachzuweisen. Der indirekte Immunfluoreszenztest von BP-/MMP- Patientenserum an diesen Zellen blieb hingegen erfolglos.

Aufgrund der Tatsache, dass eventuelle Fehler in der Methodik weitgehend ausgeschlossen werden können, muß nun die These, dass wie beim Menschen auch beim

Hund die NC16a-Region des BP180 Proteins als Hauptantigen in der Pathogenese von BP und MMP angesehen werden kann, nochmals überdacht werden.

5.5 Ausblick in die Zukunft

Der nächste Schritt besteht darin, zu versuchen eukaryote Zellen mit dem gesamten BP180 zu transfizieren.

Das von diesen Zellen rekombinant produzierte Kollagen XVII soll dann wiederum für immunhistochemische und immunserologische Untersuchungen von BP- und MMP-Patientenseren, analog dem für NC16a beschriebenen Verfahren, zur Verfügung stehen. Zum einen erhoffen wir uns mit positiven Ergebnissen beweisen zu können, dass Epitope des BP180 das Hauptantigen für Autoantikörper eines caninen BP- und MMP- Patienten darstellen.

Zum anderen würde dies bedeuten, dass wir unsere jetzigen Ergebnisse - eine korrekte Methodik und das Fehlen von anti-NC16a-Antikörpern – richtig interpretiert haben.

Daraufhin wäre zu klären, welche BP180-Epitope genau die antigenen Strukturen zur Bindung der Autoantikörper beim Hund aufweisen.

Sollte es uns gelingen, durch den indirekten Immunfluoreszenztest an mit BP180 transfizierten Zellen positive Ergebnisse zu erlangen, und somit durch diesen Test BP und MMP diagnostizieren zu können, werden wir versuchen dieses Testverfahren noch weiter zu entwickeln. Beispielsweise könnte man nach dem Prinzip des „Dot-Blot“ Verfahrens versuchen, das Protein (die BP180 produzierenden Zellen) in einer Membran zu binden. Nach Zugabe der Probenlösung (in diesem Fall das Patientenserum), bindet der darin enthaltene Antikörper an das Antigen. Anschließend wird die Lösung entfernt und der gebundene Antikörper kann durch ein markiertes Reagenz nachgewiesen werden.

Somit bestünde die Möglichkeit, ein Testsystem zu erstellen, welches wie ein „Schnelltest“ ohne großen Aufwand schon nach kurzer Zeit das Vorhandensein von anti-BP180 Antikörpern und damit den Nachweis einer BP- oder MMP- Erkrankung erbringen könnte.

VI Zusammenfassung

Das von humanen Nierenzellen produzierte canine NC16a-Protein als Substrat für immunologische und serologische Diagnostik bei Hunden mit vermutetem bullösen und Schleimhaut- Pemphigoid.

BP und MMP gehören beide zur Gruppe der subepidermal blasenbildenden Hauterkrankungen. Dabei handelt es sich um äußerst seltene Dermatosen, die alle mit der Bildung von Blasen einhergehen, welche durch die Bindung von Autoantikörpern an Strukturen der Basalmembranzzone entstehen. In der Humanmedizin gibt es zahlreiche Studien, die belegen, dass der Hauptteil aller BP- und ein Grossteil der MMP-Autoantikörper gegen Epitope innerhalb der NC16a-Region des BP180 Proteins gerichtet sind. Von dieser Tatsache geht man auch in der Tiermedizin aus.

Ziel dieser Arbeit war es, das canine NC16a von humanen Nierenzellen produzieren zu lassen. Das so produzierte NC16a sollte dann als Substrat für immunologische und serologische Diagnostik bei Hunden mit vermutetem bullösen und Schleimhautpemphigoid dienen.

Als erstes wurden die uns zur Verfügung stehenden caninen BP- und MMP-Patientensera im Immunfluoreszenztest an normaler caniner Salzspalthaut getestet. Zum einen diente dieser Test zum Nachweis vorhandener Autoantikörper gegen Basalmembran-Strukturproteine, zum anderen sollte der Antikörpertiter ermittelt werden, bis zu welchem eine Bindung der Antikörper an die Antigene durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden konnte.

Als nächstes wurde das canine NC16a kloniert. Die in dem Artikel von Xu et al. (2000) publizierte BP180-DNA-Sequenz diente uns hierbei als Vorlage, um die richtigen Primer herzustellen. Nach der Transformation des NC16a-Fragments in Bakterien wurden diese vervielfältigt und in einem Labor wurde die korrekte Sequenz des NC16A-Fragments verifiziert. Daraufhin wurde das NC16a Protein in humane embryonale Nierenzellen transfiziert. Diese Zellen wurden anschließend auf sogenannte Chamber-Slides aufgebracht und standen dadurch dem indirekten Immunfluoreszenztest (IIF) als Substrat

zur Verfügung. Hier wurde mit den gleichen BP- und MMP- Patientensera getestet, welche bereits an normaler Salzsalthaut im IIF getestet wurden.

Keines der getesteten BP- oder MMP-Seren reagierte mit dem rekombinant produzierten NC16a-Protein. Ein positiver IIF mit einem Kaninchen anti-humanem NC16a-Antikörper Serum bestätigte das Vorhandensein und die korrekte Expression des NC16a-Fragments in den transfizierten Zellen. Nachdem also die korrekte Expression von NC16a bewiesen werden konnte und auch mögliche methodische Fehler ausgeschlossen werden konnten, muß nun die These, dass wie beim Menschen auch beim Hund die NC16a-Region des BP180 Proteins als Hauptantigen in der Pathogenese von BP und MMP angesehen werden kann, nochmals überdacht werden.

VII Summary

Canine protein NC16a produced by human kidney cells as a substrate for immunological and serological diagnostic to prove bullous and mucous membrane pemphigoid in dogs.

Bullous pemphigoid (BP) and mucous membrane pemphigoid (MMP) are autoimmune subepidermal blistering diseases (AISBD). AISBD are a rare group of dermatoses that have autoantibodies that target autoantigens in the epidermal basement membrane resulting in the formation of blisters. Human studies have shown that most of the autoantibodies of BP- and MMP-patients are directed against epitopes within the NC16a-region of the protein BP180. Taking into consideration that the disease is expressed in dogs a similar manner, it is prudent to assume that this fact is also applicable in dogs. The purpose of this study was to express a recombinant canine NC16a in human embryonal kidney cells that can then be used as a substrate for immunological and serological diagnostic in dogs, assumed to suffer from BP or MMP.

Sera from BP and MMP patients were tested by an indirect immunofluorescence test (IIF) performed on normal canine salt-split skin, which proved the existence of anti-basement membrane zone antibodies. Furthermore, the antibody titers, which still showed an antibody-antigen binding, were determined.

Once titers were determined, canine NC16a was cloned. The primers were designed based on the sequence of the gene BP180, published by Xu et al. 2000. The NC16a fragment was transformed in bacteria, and then amplified. The correct DNA-Fragment was verified by sequencing. Transfected human embryonic cells with the NC16a fragment were then transferred to chamber slides so that the cells would be available for being tested by IIF. We used the same sera in the IIF on salt split skin and on the transfected cells. However, none of the tested sera reacted positive with the recombinant produced NC16a. A positive IIF with a rabbit anti human NC16a antibody serum verified the correct expression of NC16a. Having proven the correct expression of NC16a and the probable absence of methodic failures, the hypothesis that autoantibodies of canine BP-

and MMP- patients are directed against the NC16a region similar to the autoantibodies of human patients, has to be reconsidered.

VIII Literaturverzeichnis

AMO, Y., OHKAWA, T., TATSUTA, M., HAMADA, Y., FUJIMURA, T., KATSUOKA, K. and HASHIMOTO, T., 2001. Clinical significance of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *Journal of dermatological science*, 26(1), pp. 14-18.

ARMSTRONG, V.W. and OELLERICH, M., 2001. New developments in the immunosuppressive drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, and azathioprine. *Clinical biochemistry*, 34(1), pp. 9-16.

BEDANE, C., MCMILLAN, J.R., BALDING, S.D., BERNARD, P., PROST, C., BONNETBLANC, J.M., DIAZ, L.A., EADY, R.A. and GIUDICE, G.J., 1997. Bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid autoantibodies react with ultrastructurally separable epitopes on the BP180 ectodomain: evidence that BP180 spans the lamina lucida. *The Journal of investigative dermatology*, 108(6), pp. 901-907.

BERNARD, P., VAILLANT, L., LABELLE, B., BEDANE, C., ARBEILLE, B., DENOEU, J.P., LORETTE, G., BONNETBLANC, J.M. and PROST, C., 1995. Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group. *Archives of Dermatology*, 131(1), pp. 48-52.

BORRADORI, L., KOCH, P.J., NIESSEN, C.M., ERKELAND, S., VAN LEUSDEN, M.R. and SONNENBERG, A., 1997. The localization of bullous pemphigoid antigen 180 (BP180) in hemidesmosomes is mediated by its cytoplasmic domain and seems to be regulated by the beta4 integrin subunit. *The Journal of cell biology*, 136(6), pp. 1333-1347.

BORRADORI, L. and SONNENBERG, A., 1999. Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *The Journal of investigative dermatology*, 112(4), pp. 411-418.

BRAUN, I.C., ROHRBACH, E., SCHMITT, C. and IZAURRALDE, E., 1999. TAP binds to the constitutive transport element (CTE) through a novel RNA-binding motif that is sufficient to promote CTE-dependent RNA export from the nucleus. *The EMBO journal*, 18(7), pp. 1953-1965.

BURGESON, R.E. and CHRISTIANO, A.M., 1997. The dermal-epidermal junction. *Current opinion in cell biology*, 9(5), pp. 651-658.

CALABRESI, V., CARROZZO, M., COZZANI, E., ARDUINO, P., BERTOLUSSO, G., TIRONE, F., PARODI, A., ZAMBRUNO, G. and DI ZENZO, G., 2007. Oral pemphigoid autoantibodies preferentially target BP180 ectodomain. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 122(2), pp. 207-213.

- CAMPBELL K.L., 2004. Small animal dermatology secrets. Philadelphia: Hanley&Belfus, pp. 231-242.
- CARTER, W.G., RYAN, M.C. and GAHR, P.J., 1991. Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin alpha 3 beta 1 in epithelial basement membranes. *Cell*, 65(4), pp. 599-610.
- CHAN, Y.C., SUN, Y.J., NG, P.P. and TAN, S.H., 2003. Comparison of immunofluorescence microscopy, immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay methods in the laboratory diagnosis of bullous pemphigoid. *Clinical and experimental dermatology*, 28(6), pp. 651-656.
- CHIMANOVITCH, I., SCHMIDT, E., MESSER, G., DOPP, R., PARTSCHT, K., BROCKER, E.B., GIUDICE, G.J. and ZILLIKENS, D., 1999. IgG1 and IgG3 are the major immunoglobulin subclasses targeting epitopes within the NC16A domain of BP180 in pemphigoid gestationis. *The Journal of investigative dermatology*, 113(1), pp. 140-142.
- DI ZENZO, G., GROSSO, F., TERRACINA, M., MARIOTTI, F., DE PITA, O., OWARIBE, K., MASTROGIACOMO, A., SERA, F., BORRADORI, L. and ZAMBRUNO, G., 2004. Characterization of the anti-BP180 autoantibody reactivity profile and epitope mapping in bullous pemphigoid patients. *The Journal of investigative dermatology*, 122(1), pp. 103-110.
- DIMSON, O.G., GIUDICE, G.J., FU, C.L., VAN DEN BERGH, F., WARREN, S.J., JANSON, M.M. and FAIRLEY, J.A., 2003. Identification of a potential effector function for IgE autoantibodies in the organ-specific autoimmune disease bullous pemphigoid. *The Journal of investigative dermatology*, 120(5), pp. 784-788.
- DUNN, K.A., 1995. What is your diagnosis? Pemphigoid, bullous. *The Journal of small animal practice*, 36(4), pp. 146, 159.
- EGAN, C.A., REDDY, D., NIE, Z., TAYLOR, T.B., SCHMIDT, L.A., MEYER, L.J., PETERSEN, M.J., HASHIMOTO, T., MARINKOVICH, M.P. and ZONE, J.J., 2001. IgG anti-LABD97 antibodies in bullous pemphigoid patients' sera react with the mid-portion of the BPAg2 ectodomain. *The Journal of investigative dermatology*, 116(2), pp. 348-350.
- EGAN, C.A., TAYLOR, T.B., MEYER, L.J., PETERSEN, M.J. and ZONE, J.J., 1999. Bullous pemphigoid sera that contain antibodies to BPAg2 also contain antibodies to LABD97 that recognize epitopes distal to the NC16A domain. *The Journal of investigative dermatology*, 112(2), pp. 148-152.
- ESPANA, A., DEL OLMO, J., MARQUINA, M. and SITARU, C., 2005. Mucous membrane pemphigoid: IgG and IgA antibodies against the BP180 antigen. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, 96(6), pp. 365-370.

FADOK, V.A. and JANNEY, E.H., 1982. Thrombocytopenia and hemorrhage associated with gold salt therapy for bullous pemphigoid in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 181(3), pp. 261-262.

FAIRLEY, J.A., FU, C.L. and GIUDICE, G.J., 2005. Mapping the binding sites of anti-BP180 immunoglobulin E autoantibodies in bullous pemphigoid. *The Journal of investigative dermatology*, 125(3), pp. 467-472.

FAVROT, C., DUNSTON, S.M., PARADIS, M. and OLIVRY, T., 2003. Isotype determination of circulating autoantibodies in canine autoimmune subepidermal blistering dermatoses. *Veterinary dermatology*, 14(1), pp. 23-30.

FENG, S., WU, Q., JIN, P., LIN, L., ZHOU, W., SANG, H. and SHAO, C., 2008. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *International journal of dermatology*, 47(3), pp. 225-228.

FRANZKE, C.W., BRUCKNER, P. and BRUCKNER-TUDERMAN, L., 2005. Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology. *The Journal of biological chemistry*, 280(6), pp. 4005-4008.

GIUDICE, G.J., EMERY, D.J., ZELICKSON, B.D., ANHALT, G.J., LIU, Z. and DIAZ, L.A., 1993. Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 151(10), pp. 5742-5750.

GIUDICE, G.J., WILSKE, K.C., ANHALT, G.J., FAIRLEY, J.A., TAYLOR, A.F., EMERY, D.J., HOFFMAN, R.G. and DIAZ, L.A., 1994. Development of an ELISA to detect anti-BP180 autoantibodies in bullous pemphigoid and herpes gestationis. *The Journal of investigative dermatology*, 102(6), pp. 878-881.

GROSS T.L., IHRKE P.J., WALDER E.J., AFFOLTER V., 2005. Skin Diseases of the Dog and Cat - Clinical and Histologic Diagnosis. St Louis: Mosby, pp. 27-32.

HAASE, C., BUDINGER, L., BORRADORI, L., YEE, C., MERK, H.F., YANCEY, K. and HERTL, M., 1998. Detection of IgG autoantibodies in the sera of patients with bullous and gestational pemphigoid: ELISA studies utilizing a baculovirus-encoded form of bullous pemphigoid antigen 2. *The Journal of investigative dermatology*, 110(3), pp. 282-286.

HACKER-FOEGEN, M.K., ZILLIKENS, D., GIUDICE, G.J. and LIN, M.S., 2004. T cell receptor gene usage of BP180-specific T lymphocytes from patients with bullous pemphigoid and pemphigoid gestationis. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 113(2), pp. 179-186.

HERTL, M. and SCHULER, G., 2002a. Bullous autoimmune dermatoses. 1: Classification. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, 53(3), pp. 207-19; quiz 220-1.

HERTL, M. and SCHULER, G., 2002b. Bullous autoimmune dermatoses. 2: Pathogenesis. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, 53(4), pp. 277-85; quiz 285, 287.

HOFMANN, S., THOMA-USZYNSKI, S., HUNZIKER, T., BERNARD, P., KOEBNICK, C., STAUBER, A., SCHULER, G., BORRADORI, L. and HERTL, M., 2002. Severity and phenotype of bullous pemphigoid relate to autoantibody profile against the NH₂- and COOH-terminal regions of the BP180 ectodomain. *The Journal of investigative dermatology*, 119(5), pp. 1065-1073.

HOPKINSON, S.B., BAKER, S.E. and JONES, J.C., 1995. Molecular genetic studies of a human epidermal autoantigen (the 180-kD bullous pemphigoid antigen/BP180): identification of functionally important sequences within the BP180 molecule and evidence for an interaction between BP180 and alpha 6 integrin. *The Journal of cell biology*, 130(1), pp. 117-125.

IHRKE, P.J., NORTON, A.L., LING, G.V. and STANNARD, A.A., 1985. Urinary tract infection associated with long-term corticosteroid administration in dogs with chronic skin diseases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 186(1), pp. 43-46.

IWASAKI, T., OLIVRY, T., LAPIERE, J.C., CHAN, L.S., PEAHEY, C., LIU, Y.Y., JONES, J.C., IHRKE, P.J. and WOODLEY, D.T., 1995. Canine bullous pemphigoid (BP): identification of the 180-kd canine BP antigen by circulating autoantibodies. *Veterinary pathology*, 32(4), pp. 387-393.

JUNG, M., KIPPES, W., MESSER, G., ZILLIKENS, D. and RZANY, B., 1999. Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 41(2 Pt 1), pp. 266-268.

KOBAYASHI, M., AMAGAI, M., KURODA-KINOSHITA, K., HASHIMOTO, T., SHIRAKATA, Y., HASHIMOTO, K. and NISHIKAWA, T., 2002. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *Journal of dermatological science*, 30(3), pp. 224-232.

KORN, J., 2006. *Kollagen XVII: Expression und Charakterisierung rekombinanter Fragmente*, University of Luebeck.

KROMMINGA, A., SITARU, C., MEYER, J., ARNDT, R., SCHMIDT, E., CHRISTOPHERS, E., BROCKER, E.B. and ZILLIKENS, D., 2002. Cicatricial pemphigoid differs from bullous pemphigoid and pemphigoid gestationis regarding the

fine specificity of autoantibodies to the BP180 NC16A domain. *Journal of dermatological science*, 28(1), pp. 68-75.

LAFFITTE, E., SKARIA, M., JAUNIN, F., TAMM, K., SAURAT, J.H., FAVRE, B. and BORRADORI, L., 2001. Autoantibodies to the extracellular and intracellular domain of bullous pemphigoid 180, the putative key autoantigen in bullous pemphigoid, belong predominantly to the IgG1 and IgG4 subclasses. *The British journal of dermatology*, 144(4), pp. 760-768.

LAWRENCE CHAN, M., 2007. Bullous Pemphigoid. Online database. URL:<http://www.emedicine.com/DERM/topic64.htm>. .

LEVER W. F., 1953. Pemphigus. *Medicine (Baltimore)*, pp. 1-123.

LIN, M.S., FU, C.L., GIUDICE, G.J., OLAGUE-MARCHAN, M., LAZARO, A.M., STASTNY, P. and DIAZ, L.A., 2000a. Epitopes targeted by bullous pemphigoid T lymphocytes and autoantibodies map to the same sites on the bullous pemphigoid 180 ectodomain. *The Journal of investigative dermatology*, 115(6), pp. 955-961.

LIN, M.S., FU, C.L., GIUDICE, G.J., OLAGUE-MARCHAN, M., LAZARO, A.M., STASTNY, P. and DIAZ, L.A., 2000b. Epitopes targeted by bullous pemphigoid T lymphocytes and autoantibodies map to the same sites on the bullous pemphigoid 180 ectodomain. *The Journal of investigative dermatology*, 115(6), pp. 955-961.

LIU, Z. and DIAZ, L.A., 2001. Bullous pemphigoid: end of the century overview. *The Journal of dermatology*, 28(11), pp. 647-650.

MARIOTTI, F., GROSSO, F., TERRACINA, M., RUFFELLI, M., CORDIALI-FEI, P., SERA, F., ZAMBRUNO, G., MASTROGIACOMO, A. and DI ZENZO, G., 2004. Development of a novel ELISA system for detection of anti-BP180 IgG and characterization of autoantibody profile in bullous pemphigoid patients. *The British journal of dermatology*, 151(5), pp. 1004-1010.

MARTINEZ-DE PABLO, M.I., GONZALEZ-ENSENAT, M.A., VICENTE, A., GILABERTE, M. and MASCARO, J.M.,JR, 2007. Childhood bullous pemphigoid: clinical and immunological findings in a series of 4 cases. *Archives of Dermatology*, 143(2), pp. 215-220.

MATSUMURA, K., AMAGAI, M., NISHIKAWA, T. and HASHIMOTO, T., 1996. The majority of bullous pemphigoid and herpes gestationis serum samples react with the NC16a domain of the 180-kDa bullous pemphigoid antigen. *Archives of Dermatological Research*, 288(9), pp. 507-509.

MEDLEU L., HNILICA K.A., 2006. *Small Animal Dermatology: A Color Atlas and Therapeutic Guide*. Philadelphia: WB Saunders, pp. 202-203.

MUELLER R.S., 2006. Dermatologie für den Kleintierpraktiker. Babenhausen: Beate Egner VetVerlag.

MUELLER, R.S., KREBS, I., POWER, H.T. and FIESELER, K.V., 2006. Pemphigus foliaceus in 91 dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 42(3), pp. 189-196.

NAKATANI, C., MURAMATSU, T. and SHIRAI, T., 1998. Immunoreactivity of bullous pemphigoid (BP) autoantibodies against the NC16A and C-terminal domains of the 180 kDa BP antigen (BP180): immunoblot analysis and enzyme-linked immunosorbent assay using BP180 recombinant proteins. *The British journal of dermatology*, 139(3), pp. 365-370.

NIESSEN, C.M., HULSMAN, E.H., OOMEN, L.C., KUIKMAN, I. and SONNENBERG, A., 1997. A minimal region on the integrin beta4 subunit that is critical to its localization in hemidesmosomes regulates the distribution of HD1/plectin in COS-7 cells. *Journal of cell science*, 110 (Pt 15)(Pt 15), pp. 1705-1716.

OLIVRY, T., 2008. Olivry, unpublished data.

OLIVRY, T., BORRILLO, A.K., XU, L., DUNSTON, S.M., SLOVIS, N.M., AFFOLTER, V.K., DEMANUELLE, T.C. and CHAN, L.S., 2000. Equine bullous pemphigoid IgG autoantibodies target linear epitopes in the NC16A ectodomain of collagen XVII (BP180, BPAG2). *Veterinary immunology and immunopathology*, 73(1), pp. 45-52.

OLIVRY, T., CHAN, L.S., XU, L., CHACE, P., DUNSTON, S.M., FAHEY, M. and MARINKOVICH, M.P., 1999. Novel feline autoimmune blistering disease resembling bullous pemphigoid in humans: IgG autoantibodies target the NC16A ectodomain of type XVII collagen (BP180/BPAG2). *Veterinary pathology*, 36(4), pp. 328-335.

OLIVRY, T., DUNSTON, S.M., SCHACHTER, M., XU, L., NGUYEN, N., MARINKOVICH, M.P. and CHAN, L.S., 2001. A spontaneous canine model of mucous membrane (cicatricial) pemphigoid, an autoimmune blistering disease affecting mucosae and mucocutaneous junctions. *Journal of Autoimmunity*, 16(4), pp. 411-421.

PERRIARD, J., JAUNIN, F., FAVRE, B., BUDINGER, L., HERTL, M., SAURAT, J.H. and BORRADORI, L., 1999. IgG autoantibodies from bullous pemphigoid (BP) patients bind antigenic sites on both the extracellular and the intracellular domains of the BP antigen 180. *The Journal of investigative dermatology*, 112(2), pp. 141-147.

SAKUMA-OYAMA, Y., POWELL, A.M., OYAMA, N., ALBERT, S., BHOGAL, B.S. and BLACK, M.M., 2004. Evaluation of a BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assay in the initial diagnosis of bullous pemphigoid. *The British journal of dermatology*, 151(1), pp. 126-131.

SCHMIDT, E., REIMER, S., KRUSE, N., JAINTA, S., BROCKER, E.B., MARINKOVICH, M.P., GIUDICE, G.J. and ZILLIKENS, D., 2000. Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*, 115(5), pp. 842-848.

SCOTT D.W., MILLER W., GRIFFIN C.E., 2001. Muller's and Kirk's Small Animal Dermatology. Philadelphia: W.B. Saunders, pp. 573-577.

SCOTT D.W., WALTON D.K., SLATER M.R., SMITH C.A., LEWIS R.M., 1987. Immunemediated dermatoses in domestic animals: Ten years after - Part I. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 9, pp. 424-435.

SCOTT, D.W., MANNING, T.O. and LEWIS, R.M., 1982. Linear IgA dermatoses in the dog: bullous pemphigoid, discoid lupus erythematosus and a subcorneal pustular dermatitis. *The Cornell veterinarian*, 72(4), pp. 394-402.

SCULLY, C., CARROZZO, M., GANDOLFO, S., PUIATTI, P. and MONTEIL, R., 1999. Update on mucous membrane pemphigoid: a heterogeneous immune-mediated subepithelial blistering entity. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 88(1), pp. 56-68.

SHINOJIMA, Y., OCHIAI, T., KAWAMURA, A., ARAKAWA, H., FUKUDA, K. and HASHIMOTO, T., 2005. A case of bullous pemphigoid associated with autoantibodies targeting antigenic sites other than the NC16a domain of BP180. *Clinical and experimental dermatology*, 30(5), pp. 503-505.

SITARU, C., DAHNRICH, C., PROBST, C., KOMOROWSKI, L., BLOCKER, I., SCHMIDT, E., SCHLUMBERGER, W., ROSE, C., STOCKER, W. and ZILLIKENS, D., 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. *Experimental dermatology*, 16(9), pp. 770-777.

SITARU, C., SCHMIDT, E., PETERMANN, S., MUNTEANU, L.S., BROCKER, E.B. and ZILLIKENS, D., 2002. Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *The Journal of investigative dermatology*, 118(4), pp. 664-671.

STEPHENSON, F.H., 2005. Mathematik im Labor
Ein Arbeitsbuch für Molekularbiologie und Biotechnologie. 1 edn. München: Elsevier.

TURNWALD, G.H., OCHOA, R. and BARTA, O., 1981. Bullous pemphigoid refractory to recommended dosage of prednisolone in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 179(6), pp. 587-591.

TYAGI, S., BHOL, K., NATARAJAN, K., LIVIR-RALLATOS, C., FOSTER, C.S. and AHMED, A.R., 1996. Ocular cicatricial pemphigoid antigen: partial sequence and biochemical characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), pp. 14714-14719.

WHITE, S.D., ROSSER, E.J., JR, IHRKE, P.J. and STANNARD, A.A., 1984. Bullous pemphigoid in a dog: treatment with six-mercaptopurine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185(6), pp. 683-686.

XU, L., O'TOOLE, E.A., OLIVRY, T., HERNANDEZ, C., PENG, J., CHEN, M. and CHAN, L.S., 2000. Molecular cloning of canine bullous pemphigoid antigen 2 cDNA and immunomapping of NC16A domain by canine bullous pemphigoid autoantibodies. *Biochimica et biophysica acta*, 1500(1), pp. 97-107.

YANG, Y., DOWLING, J., YU, Q.C., KOUKLIS, P., CLEVELAND, D.W. and FUCHS, E., 1996. An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell*, 86(4), pp. 655-665.

ZILLIKENS, D., MASCARO, J.M., ROSE, P.A., LIU, Z., EWING, S.M., CAUX, F., HOFFMANN, R.G., DIAZ, L.A. and GIUDICE, G.J., 1997. A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *The Journal of investigative dermatology*, 109(5), pp. 679-683.

ZILLIKENS, D., ROSE, P.A., BALDING, S.D., LIU, Z., OLAGUE-MARCHAN, M., DIAZ, L.A. and GIUDICE, G.J., 1997. Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. *The Journal of investigative dermatology*, 109(4), pp. 573-579.

IX Anhang

9.1 Material

9.1.1 Verbrauchsmaterial

Objektträger – Colorfrost/Plus	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Deckgläser – Corning Life	Science, Wilkes Barre, PA
Pipetten Tips – Tip One	USA Scientific Inc., Ocala, FL
Pipetten Tips	Eppendorf Research, Westbury, NY
Pipetten Tips – Great Barrier Tips	Life Ware, Durham, NC
Sterile Röhrchen	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Polypropylene Röhrchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ
DNA-Excisions Pipette	USA Scientific Inc., Ocala, FL
T75 Zellkulturflaschen	BD Bioscience, Bedford, MA
Chamberslides	Nalge Nunc International, Rochester, NY
Zell Sieb (Cell Stainer)	BD Bioscience, Bedford, MA
Zellkulturflaschen T75	BD Bioscience, Bedford, MA

9.1.2 Geräte

Gefrierschneidemaschine	Hacker Instruments Inc., Fairfield, NJ
Epifluoreszenzmikroskop	Olympus Bx60, Opelco
Zentrifuge - IEC Micromax	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Zentrifuge – Allegra 64R	Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA
Zentrifuge – Allegra 6 R	Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA
Spektrometer- NanoDrop®ND1000	Nano Drop Techn. Inc., Wilmington, DE
Thermocycler – PTC 100	MJ Research Inc., Waltham, MA
Horizontal Shaker/Inkubator	Labline , Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Inkubator – DHD Autoflow	Nuaire, Plymouth, MN
Inkubator – Precision	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Elektrophorese Kamera - Eclipse	Fotodyne, Hartland, WI
Zählkammer (Hemacytometer)	Reichert, Buffalo, NY
Gelelektrophorese Kammer	BioRad, Hercules, CA

Elektrophorese Spannungsgerät Pharmacia Biotech, San Francisco, CA

9.1.3 Gebrauchsfertige Testkits

Reverse transcription Kit Promega, Madison, WI.
 MinElute Gel Extraction Kit Quiagen, Valencia, CA
 TOPO Cloning Reaction Kit Invitrogen, Carlsbad, CA
 Quiaprep Spin Miniprep Kit Quiagen, Valencia, CA
 QIAquick Gel Extraction Kit Quiagen, Valencia, CA

9.1.4 Chemikalien

Aceton Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
 1M Natrium-Chlorid Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
 Flüssiger Stickstoff Linde Gas LLC, Independence, OH
 Fetales Kälberserum Sigma, St. Louis, MO
 Evan's Blue (5% Lsg.) Sigma, St. Louis, MO
 Vectashield/DAPI Vector Laboratories, Burlingame, CA
 TRIZOL® Reagenz Invitrogen, Carlsbad, CA
 Chloroform Sigma, St. Louis, MO
 Isopropyl Alkohol Sigma, St. Louis, MO
 75% Ethanol Pharmco, Brookfield, CT
 Nuklease freies Wasser Ambion, Forster City, CA
 PCR-Puffer – Coral Load Quiagen, Valencia, CA
 dNTP Roche, Nutley, NJ
 DNA Polymerase – Hotstar Quiagen, Valencia, CA
 DNA Polymerase – HIFI Roche Applied Science, Indianapolis, IN
 Ethidiumbromid Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
 Carbenicillin Duchefa, Netherland
 BamHI Promega, Madison, WI
 KpnI Promega, Madison, WI
 Multicore Pufferlsg. Promega, Madison, WI
 BSA Promega, Madison, WI

Sodium Pyruvate	Invitrogen, Carlsbad, CA
Pen/strep	Sigma, St. Louis, MO
T4-Ligase	Promega, Madison, WI
Glutamax	Invitrogen, Carlsbad, CA
Fugene6	Roche Applied Science, Indianapolis, IN
Sterile 1x PBS Lsg.	Mediatech Inc., Herndon, VA
Trypsin versene	Lonza, Walkersville, MD
Methanol	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Kaninchen Serum	Sigma, St. Louis, MO
Hyper ladder IV	BioLine, Taunton, MA
Hi-mark-ladder	Mc Connell Research Corp., Stanford, CA
Ampicillin	Sigma, St. Louis, MO
Tryptan Blue Lsg.	Mediatech Inc., Herndon, VA
Agarose – Ultra Pure	Invitrogen, Carlsbad, CA

9.1.5 Zellen

HEK 293 T Zellen	ATCC, Manassas, VA
------------------	--------------------

9.1.6 Bakterien

One Shot®Top10 E.coli	Invitrogen, Carlsbad, CA
-----------------------	--------------------------

9.1.7 Plasmide

pcDNA3.1/V5-HIS-TOPO	Invitrogen, Carlsbad, CA
pND14	Dr Gary Rhodes, UCD, Davis, CA

9.1.8 Media

SOC-Medium	Invitrogen, Carlsbad, CA
Lb-Medium	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Lb-Broth	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ
DMEM-Medium	Invitrogen, Carlsbad, CA
Optimem-Medium	Invitrogen, Carlsbad, CA

9.1.9 Rezepte

10xPBS

Folgendes wurde in 800 ml destilliertem Wasser aufgelöst:

80 g NaCl	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
2 g KCl	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
14,4 g Natrium-Phosphat-Monobasisch	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
2.4 g Mono-Kalium- Phosphat	Sigma, St. Louis, MO

Angleichung des pH auf 7,4 und Auffüllung des Volumens auf einen Liter mit zusätzlichem destilliertem Wasser.

Orange Puffer

Füge zu 7 ml destilliertem und autoklaviertem Wasser Folgendes hinzu:

3 ml Glycerol	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
Orange G (bis Lsg. tief orange)	Sigma, St. Louis, MO

50xTAE

Ein 1-Liter Gefäß wurde mit 500 ml destilliertem Wasser gefüllt. Darin wurde folgendes gänzlich aufgelöst:

242 g Trizma	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA
37,2 g Disodium EDTA	Ambion, Forster City, CA
57,1 ml Acetat	Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ

Diese Lösung wird anschließend bis zu einem Volumen von 800 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und zugedeckt für drei-vier Stunden oder über Nacht stehen gelassen. Mit Azetat oder TRIZMA Base wird der pH auf 8,05 eingestellt und mit destilliertem Wasser zu einem Volumen von einem Liter aufgefüllt.

9.2 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1 Strukturen der Basalmembran, welche in humanen hereditären und erworbenen bullösen Dermatosen eine Rolle spielen (Hertl, Schuler 2002b).
- Tab.2 Therapie: Immunsuppressive Medikamente, deren Dosierung und Nebenwirkungen.
- Tab.3 Signalement der verwendeten Patienten-Sera und den Titern, bis zu welchem eine Antikörperbindung im IIF sichtbar gemacht werden konnte.
- Tab.4 Im IIF verwendete primäre Antikörper, deren Bezugsquellen und die verwendeten Verdünnungen.
- Tab.5 Im IIF verwendete sekundäre Antikörper, deren Bezugsquellen und die verwendeten Verdünnungen.
- Tab.6 Prozentuale Bindungsrate der Autoantikörpern an Epitope des BP180. Die Auswertung von Studien aus der Humanmedizin lieferte uns diese Zahlen.

9.3 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Canines BP. Blasen- und Krustenbildung im konkaven Teil des Ohres (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).
- Abb. 2: Canines MMP. Ulzera, Krusten und Depigmentation im Bereich der Nase (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).
- Abb. 3: Canines MMP. Blasenbildung im Bereich des mukokutanen Übergangs der äußeren Lippe (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).
- Abb. 4: Canines MMP, Ulzera und Krustenbildung an der Innenseite des Ohres (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).
- Abb. 5: Canines MMP, Ulzeration und Entzündung der Konjunktivschleimhaut (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).
- Abb. 6: Darstellung der wichtigsten Proteine des Hemidesmosom-Filament-Komplexes (modifiziert nach Olivry, 2006) (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).
- Abb. 7: Darstellung des Kollagen XVII. Es besteht aus einem NH₂ terminalen intrazellulären Teil, einem transmembranen Teil und einem COOH-terminalem extrazellulärem Teil. (modifiziert nach Borradori (Borradori, Sonnenberg 1999)).
- Abb. 8: Die Abbildung zeigt eine der drei 180-kDA Ketten des Homotrimers BP180. Die Pfeile symbolisieren die AS-Abschnitte, welche antigenes Potential in den oben erwähnten Studien zeigten. Die Kreise beinhalten die durchschnittliche Antikörper-Bindungsrate an die Epitope.

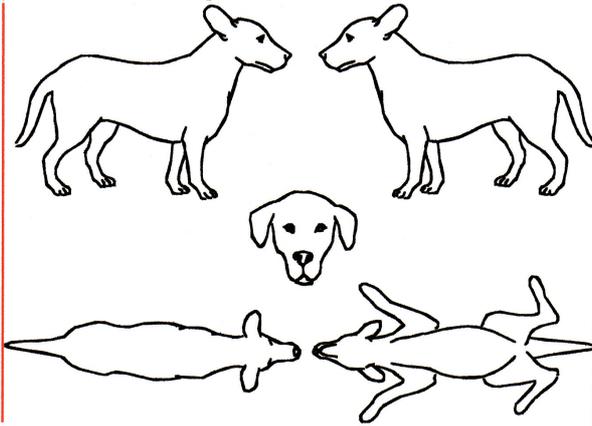
- Abb. 9: Canines MMP: Deutliche Trennung von Epidermis und Dermis unterhalb der Basalmembran. Ansammlung von roten Blutzellen und neutrophilen Granulozyten innerhalb der Blase. Einwanderung von Entzündungszellen in die obere Dermis (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).
- Abb. 10: Canines BP: Subepidermale Spaltbildung mit einem von der Dermis ausgehendem Mikroabszess, bestehend aus neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).
- Abb. 11: IIF: Canines MMP, Bindung der Autoantikörper hier an der epidermalen Seite des Blasendaches (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).
- Abb. 12: Direkter Immunfluoreszenztest. Nachweis der IgM gewebegebundenen Autoantikörper eines MMP-Patienten (mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis).
- Abb. 13: Nukleotide und die abgeleitete AS-Sequenz. Die abgeleitete AS-Sequenz beinhaltet die gesamte Intrazelluläre Domäne (AS 1–467), das transmembranöse Segment (unterstrichen, AS 468–490), die extrazelluläre Nc16a-Sequenz (durch T und T eingeklammert, AS 491–567), und das schmale Segment des extrazellulären Kollagen-Segments (nur teilweise, AS 568–709) (GenBank accession no. AF016649) (Text und Abb.: (Xu, O'Toole et al. 2000)).
- Abb. 14: pcDNA3.1/V5-HIS-TOPO Plasmid (Quelle: www.invitrogen.com).
- Abb. 15: Gelelektrophorese: Screening von Bakterienklonen, und Nachweis der Inkorporierung des NC16a-Fragments.
- Abb. 16: Wiederholung der Gelelektrophorese.

- Abb. 17: Übereinstimmung der ermittelten DNA-Sequenz und der veröffentlichten caninen Genom Sequenz (Genbank accession- #: AF016649).
- Abb. 18: pND14-Plasmid.
- Abb. 19: Gelelektrophorese: Screening von 7 Bakterienkolonien.
- Abb. 20: Gelelektrophorese: Digestion zweier Bakterienkolonien.
- Abb. 21: IIF an normaler Salzsalthaut: Im linken Bild sieht man die deutliche Bindung der Kaninchen anti-humanes-NC16a-Antikörper an der epidermalen Seite des Spaltes (Verdünnung 1:10). Rechts wurde normales Kaninchenserum zum Ausschluß einer unspezifischen Antikörperbindung getestet.
- Abb. 22: IIF an transfizierten und nicht transfizierten Zellen:
Die positive V5-Antikörper Reaktion beweist die korrekte Transfektion und das Vorhandensein des Plasmids in den transfizierten Zellen. Die positive Reaktion der transfizierten Zellen mit dem anti-humanem-NC16a Kaninchenserums beweist die korrekte Expression des NC16a-Fragments. Als Negativ-Kontrolle diente der Test an nicht transfizierten Zellen. Hier konnte weder bei V5, NC16a noch bei den Kontrollseren eine positive Reaktion festgestellt werden.
- Abb. 23: IIF an transfizierten Zellen: Sowohl das Kontrollserum wie auch das MMP-Serum zeigen weder an transfizierten noch an nicht transfizierten Zellen Fluoreszenz.

9.4 Tierärzfragebogen

	North Carolina State University is a land-grant university and a constituent institution of The University of North Carolina	College of Veterinary Medicine Department of Clinical Sciences
NC STATE UNIVERSITY	Thierry Olivry, Dr.-Vet., PhD Diplomate A.C.V.D. Diplomate E.C.V.D. Professor of Immunodermatology	4700 Hillsborough Street Raleigh, North Carolina 27606 Phone: (919) 513-7711 Fax: (919) 513-6336 E-mail: Thierry_Olivry@ncsu.edu
Autoimmune Subepidermal Blistering Diseases Clinical Questionnaire		
Veterinarian:		
Name:	Address:	
Phone:	Fax:	Email:
Pathologist:		
Name:	Address:	
Phone:	Fax:	Email:
Pathology number:		
Animal:		
Animal's name:	Owner's name:	
Breed:	Sex:	Age:
Coat color:		
Historical Information:		
Age of Onset:	First lesion(s) observed:	
Localization of first lesion(s):		
Previous treatments (medication, dosage, duration of therapy, outcome):		
Other pertinent historical information:		
Physical Examination:		
Lesion Type:		
vesicles <input type="checkbox"/>	bullae <input type="checkbox"/>	pustules <input type="checkbox"/>
scaling <input type="checkbox"/>	crusting <input type="checkbox"/>	
erosions <input type="checkbox"/>	ulcers <input type="checkbox"/>	
pigmentary changes <input type="checkbox"/>	describe:	
erythematous macules <input type="checkbox"/>	erythematous wheals <input type="checkbox"/>	
other signs of inflammation <input type="checkbox"/>	describe:	
other (describe):		
pruritus? <input type="checkbox"/>	pain? <input type="checkbox"/>	
nondermatological symptoms (fever, lymphadenomegaly, etc...)(describe):		

Lesion Distribution: please fill-out the silhouettes and indicate the lesions



Lesions in the oral cavity? (Describe what and where...)

Outcome:

Treatments administered (medication, dosage, duration of therapy, outcome):

Did the dog develop systemic symptoms, lesions, or biological abnormalities? (Y/N)

If yes, describe:

Is the dog still alive ? (Y/N)

Material Provided:

Clinical photographs Histopath block (indicate block number: _____)

H&E stained sections Serum

Fresh specimens for congelation

Authorization to Use the Material:

I, _____, hereby authorize Thierry Olivry to utilize the present material in any presentation/publication of case-studies on autoimmune blistering diseases. I understand that, even though providing cases does not qualify me for co-authorship following the guidelines published in *Veterinary Dermatology*, my gift of study material will be acknowledged in all publications.

Signature: _____ Date: _____

Instructions to Send the Serum/Slides/Tissue:

- Collect serum, preferably when the patient is not being treated with immunosuppressive drug regimens
- Freeze the serum once spun and keep frozen until sent to NCSU
- Contact tolivry@ncsu.edu and stan_dunston@ncsu.edu to inform that you wish to send serum to inquire if someone will be available to receive it
- Send preferably on a Monday or Tuesday, overnight by special courier with an ice pack in the box.
- Email the tracking number, if possible, to the email addresses above.

Address to send the sample:

Thierry Olivry / Stan Dunston
Research Building 218
NC State University College of Veterinary Medicine
4700 Hillsborough Street
Raleigh, NC 27606
Phone (lab): (919) 513-7719

9.5 Tabelle 6: Prozentuale Antikörperbindung an BP180

AUTHOR	YEAR	Extracellular domain of BP180				Intracellular domain of BP180							
		AA 1200-1497(COOH)	AA 1198-1107	AA 915	AA 531-497 (LABD97)	not defined	AA 178-203	AA151-170	AA293-354	not defined			
Guidice et al.	1983	73% (BP)	100% (FG)										
Guidice et al.	1984	53% (BP), 73% (FG) just tested against NC16A-1											
Masumura et al.	1986	80 % (BP), 73% (FG)											
Zillikens et al.	1987		94%										
Bedone et al.	1987	majority of BP sera											
Zillikens et al.	1987	majority of CP sera											
Heasle et al.	1988												
Chinnomochi et al.	1988	100% (FG)							89.7% (BP)				
Nakakami et al.	1988		91.00%	23.50%									
Perinard et al.	1989		86.59%										
Egan et al.	1989		83.30%					75%					59.09%
Lin et al.	2000		66.69%										
Egan et al.	2001							73%					
Liu, Diaz	2001		67%										
Lariffe et al.	2001								100%				
Aono et al.	2001	NC16A is the most immunogenic and probably pathogenic region in bullous pemphigoid (BP).											63%
Hoffmann et al.	2002		80%	47.03%									
Kobayashi et al.	2002		84.40%										
Sitaru et al.	2002	antibodies to human BP180 induce subepidermal splits in crosssections of human skin, which confirms that BP180 plays a key part in the pathogenesis of BP. These pathogenic mechanisms are mediated by autoantibodies targeting epitopes within the NC16A domain.											
Komnig et al.	2002	majority											
Dimson et al.	2003		88%										
Chan et al.	2003		86.00%										
Di Zazzo et al.	2004		59.60%	15.60%	8.80%	14%			38.80%	10.50%	12.30%	10.50%	26%
Marchetti et al.	2004		82.05%	6.41%	3.85%					2.56%	1.28%		
Hecker-Frohnen et al.	2004	majority		some									some
Sakuma-Oyama et al.	2004		89.00%										
España et al.	2005	40.00% (MMP)		80.00% (MMP)					80.00% (MMP)				
Fahley et al.	2005	80% (FG), 30% (GE)											
Shinohira et al.	2005	Most antigenic site of BP180 is the NC16A domain of BP180, but our findings indicate, that there is an antigenic reactive region other than NC16A on the extracellular domain.											
Korn et al.	2006	majority		40.00%									20.00 - 40.00%
Guidicci et al.	2007	80% (BP), 45% (MMP)		20% (MMP), 30% (BP)	15% (MMP), 30% (BP)	20%			45% (MMP)	20% (BP)			
Marinhez et al.	2007	66.66% (2/3)			33.33%								
Sitaru et al.	2007	89.80% (BP), 100% (FG)											
Fang et al.	2008	87.82% (BP)											
AVERAGE		82.52% (BP), 42.53% (MMP), 90.43% (FG)	28% (BP), 50% (MMP)	14.2% (BP), 15% (MMP)	17% (BP)	75% (just test for LABD97)	52.53% (MMP), 75.50% (BP)		11.02%	9.50%	10.50%	42.80%	
Immunoblot													
ELISA													

Tab. 6: Prozentuale Bindungsrate der Autoantikörper an Epitope des BP180. Die Auswertung von Studien der Humanmedizin lieferte uns diese Zahlen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nina Maria Fischer
Geburtsdatum: 08.06.1982
Geburtsort: Kempten
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Bräunlings 25
87509 Immenstadt
Telefon: +49 8323/98390
Mobil: +49 1703270376
E-mail: ninifischer@gmx.de

Schulbildung

1988 – 1992 Grundschule Stein, Immenstadt im Allgäu
1992-2001 Gymnasium Immenstadt
Juli 2001 Allgemeine Hochschulreife

Studium

Okt. 2001 – Okt. 2002 Studienbeginn der Tiermedizin an der Universität Leipzig
Sept. 2002 Abschluss des Vorphysikums an der Universität Leipzig
Okt. 2002 Wechsel von der Universität Leipzig an die LMU München
Okt. 2002 – Mai 2007 Studium der Tiermedizin an der LMU München
Sept. 2003 Abschluss des Physikums
April 2005 Erste tierärztliche Prüfung
Juni 2006 Zweite tierärztliche Prüfung
März 2007 Dritte tierärztliche Prüfung und Abschluss des Tiermedizinstudiums
Mai 2007 Erlangung der Approbationsurkunde zur Tierärztin

- Aug. 2007 – Juli 2008 Forschung zur Erlangung des Dokortitels an der NCSU, NC, USA unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr.R. Müller (LMU München) und Prof. Dr. T. Olivry (North Carolina State University, USA)
- Oktober 2008 Einreichen der Dissertation an der LMU München unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. R. Müller

Berufserfahrung / Praktika

- Juli 2001 - Sept. 2001 Kleintierpraxis
Dr. Neumaier, Immenstadt
- Feb. 2002 - März 2002 Landwirtschaftliches Praktikum
Landwirtschaft, Müller, Ofterschwang
- Feb. 2003 - März 2003 Klein- und Großtierpraxis
Dr. Sanchez, San Vicente, Argentinien
- Feb. 2004 - März 2004 Klein- und Großtierpraxis
Dr. Bartmann, Sulzberg
- Aug. 2004 - Sept. 2004 Hygienepraktikum
Landratsamt, Allgäu
- April 2005 - April 2006 Klinische Rotation der LMU München
Schwerpunkte:
Kleintier: Innere Medizin, Kardiologie, Dermatologie, Radiologie
Großtier: Chirurgie
- März 2006 - April 2006 Schlachthofpraktikum
Schlachthof, Kempten

Sept. 2006 - Nov. 2006	<u>Universität Zürich</u> <u>Kleintier</u> : Innere Medizin, Chirurgie, Dermatologie <u>Pferd</u> : Innere Medizin, Chirurgie
Nov. 2006 - Dez. 2006	<u>Klein- und Großtierklinik</u> Tierklinik Rossweid, Gockhausen, Zürich
Dez. 2006 - Jan. 2007	<u>Kleintierpraxis</u> Dr. Neumaier, Immenstadt
Juli 2008 – Dez. 2008	<u>Kleintierpraxis</u> Bei Dr. Neumaier tierärztlich tätig
Seit Januar 2009	<u>Tierspital Zürich</u> Internship - Kleintiere
Sonstiges	
Doktorarbeit:	„Das von humanen Nierenzellen produzierte canine NC16a-Protein als Substrat für immunologische und serologische Diagnostik bei Hunden mit vermutetem bullösen und Schleimhaut- Pemphigoid.“ Prof. Dr. Ralf Müller, LMU München Prof. Dr. Thierry Olivry, North Carolina State University
Publikationen:	„Der Pemphigoid-Komplex“, Oktoberausgabe 2008 „Kleintierpraxis, Scharper Verlag“
Fortbildung:	Teilnahme am North American Veterinary Dermatology Forum (Denver, CO, April 2008)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Ralf Müller. Er ermöglichte es mir die Forschung für meine Doktorarbeit in den USA an der NCSU zu absolvieren und stand mir auch zu dieser Zeit, trotz der weiten Entfernung, bei allen Fragen zur Seite. Seine umfassende, zügige und vor allem immer nette und freundliche Betreuung war mir ein großer Rückhalt.

Kein geringerer Dank gilt Herrn Professor Dr. Thierry Olivry. Er schenkte mir sein Vertrauen und ließ mich weitgehend selbstständig in seinem Labor der NCSU arbeiten. Er half mir in jeglicher Hinsicht das Projekt zu verwirklichen, vertiefte mein Interesse an der Dermatologie, war ein hervorragender Lehrer und stand mir immer freundschaftlich zur Seite.

Frau Professor Dr. Katrin Hartmann danke ich für die Möglichkeit, dass ich diese Arbeit in der Medizinischen Kleintierklinik erstellen konnte.

Ebenfalls danken möchte ich den Labor-Mitarbeitern der NCSU: Herrn Stan Dunston, Frau Erin Egan, Frau Alora Lavoy, Herrn Prof. Greg A. Dean und Frau Sitka Eguiluz-Hernandez. Alle unterstützten mich mit viel Geduld bei meiner Arbeit.

Weiter danke ich Herrn Dr. Michael Fischer, Frau Sophie Zötler und Frau Dr. Luitz; ebenso Peter Berchtold, der zu jeder Zeit mit viel Geduld und Verständnis für mich da war.

Mein tiefer Dank gilt meinen Eltern. Durch Sie war mir das Studium und diese Dissertation möglich und immer begleitete mich Ihre liebevolle, ausdauernde, moralische und fachliche Kompetenz.