

Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Michael Hertl
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg



Titel der Dissertation:

**KORRELATION KLINISCHER UND IMMUNSEROLOGISCHER
DATEN BEI PATIENTEN MIT BULLÖSEM PEMPHIGOID
MITTELS DER ENTWICKLUNG EINES
KRANKHEITSAKTIVITÄTSSCORES UND UNTER
VERWENDUNG VON ELISA-DATEN**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Katharina Genthner aus Pforzheim

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
6. Juli 2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. med. Matthias Rothmund
Referent:	Prof. Dr. med. Michael Hertl
1. Korreferent:	PD Dr. med. Holger Garn

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1	ÜBERSICHT BULLÖSER AUTOIMMUNDERMATOSEN	1
1.2	DEFINITION DES BULLÖSEN PEMPHIGOIDS	3
1.3	HISTORIE	3
1.4	EPIDEMIOLOGIE	4
1.5	PATHOGENESE DES BULLÖSEN PEMPHIGOIDS	4
1.5.1	STRUKTUR UND FUNKTION DER BASALMEMBRANZONE	5
1.5.2	DAS ZIELANTIGEN BP180	6
1.5.3	DAS ZIELANTIGEN BP230	8
1.5.4	„EPITOPE SPREADING“	9
1.5.5	KOMPONENTEN DER PATHOGENESE	10
1.5.5.1	Vom Autoantigen zur Autoantikörper-Produktion	10
1.5.5.2	Vom Antigen-Antikörper-Komplex zur Blasenbildung	13
1.6	KLINISCHES ERSCHEINUNGSBILD	14
1.7	SCORES ZUR ERMITTLUNG DER KRANKHEITSAKTIVITÄT	16
1.8	DIAGNOSTIK	19
1.8.1	HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG	19
1.8.2	DIREKTE UND INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ	20
1.8.3	IMMUNSEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	21
1.9	DIFFERENTIALDIAGNOSEN	23
1.9.1	PEMPHIGOID-GRUPPE	23
1.9.1.1	Pemphigoid gestationis (Herpes gestationis)	24
1.9.1.2	Vernarbendes Schleimhautpemphigoid	24
1.9.1.3	Sehr seltene Varianten	25
1.9.2	EPIDERMOLYSIS BULLOSA ACQUISITA	25
1.9.3	LINEARE IGA-DERMATOSE	25
1.9.4	DERMATITIS HERPETIFORMIS DUHRING	26
1.10	THERAPIE UND PROGNOSE	27
<u>2</u>	<u>ZIEL DER UNTERSUCHUNG</u>	<u>29</u>
<u>3</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>31</u>
3.1	PATIENTENKOLLEKTIV	31
3.2	ERMITTLUNG DER KRANKHEITSAKTIVITÄT ANHAND EINES SCORES	32
3.2.1	BERECHNUNG DES SCORES	32
3.2.1.1	Bestimmung des Punktwertes für die Areale Kopfhaut, Gesicht/ Nacken, Brust, Abdomen, Rücken und Schleimhäute	33
3.2.1.2	Bestimmung des Punktwertes für die Extremitäten-Areale	33
3.2.1.3	Zusammenfassende Darstellung der Berechnung des Scores	34
3.2.2	ZUORDNUNG/ INTERPRETATION ABWEICHENDER BEGRIFFLICHKEITEN	35
3.2.3	EXEMPLARISCHE SCOREBERECHNUNG FÜR DIE PATIENTEN 1 BIS 3	36
3.2.3.1	Scoreberechnung für Patient 1	36
3.2.3.2	Scoreberechnung für Patient 2	37
3.2.3.3	Scoreberechnung für Patient 3	38

3.3	ERMITTLUNG DER ELISA-DATEN	39
3.3.1	EXPRESSION UND AUFREINIGUNG VON BP180- UND BP230- REKOMBINANTEN PROTEINEN	41
3.3.2	ELISA-ANALYSEN UNTER VERWENDUNG BP180- UND BP230- REKOMBINANTER 43 PROTEINE	43
3.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG	46
<u>4</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>47</u>
4.1	ERGEBNISSE DER SCOREBERECHNUNG SOWIE ELISA- UND.....	47
	EPIDEMIOLOGISCHE DATEN	47
4.2	GESAMTKOLLEKTIV	53
4.2.1	ALTERS-, GESCHLECHTS- UND SCOREVERTEILUNG DES GESAMTKOLLEKTIVS	53
4.2.2	ERGEBNISSE DER EINZELKONSTRUKTUNTERSUCHUNGEN DES GESAMTKOLLEKTIVS 54	
4.2.3	ANTIKÖRPERPROFIL DES GESAMTKOLLEKTIVS	58
4.3	SUBKOLLEKTIV	59
4.3.1	ALTERS-, GESCHLECHTS- UND SCOREVERTEILUNG DES SUBKOLLEKTIVS	59
4.3.2	ERGEBNISSE DER EINZELKONSTRUKTUNTERSUCHUNGEN DES SUBKOLLEKTIVS ..	60
4.3.3	ANTIKÖRPERPROFIL DES SUBKOLLEKTIVS	66
4.3.4	ASSOZIATION DES PEMPHIGOID-INDEX WERTES MIT DER HÖHE DES SCORES	68
4.4	KLINISCHE UND IMMUNSEROLOGISCHE DATEN IM THERAPIEVERLAUF	71
<u>5</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>74</u>
<u>6</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY</u>	<u>88</u>
6.1	ZUSAMMENFASSUNG	88
6.2	SUMMARY	90
<u>7</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>92</u>
<u>8</u>	<u>VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER</u>	<u>101</u>
<u>9</u>	<u>DANKSAGUNG.....</u>	<u>102</u>

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	
°C	Grad Celsius	
α	Alpha	
α 1-PI	Alpha-1-Proteinase-Inhibitor	
Aa	Aminosäure	<i>Amino acid</i>
Abb.	Abbildung	
AcNPV	Baculovirus	<i>Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus</i>
Ak	Antikörper	
AS	Aminosäure	
β	Beta	
bds.	Beidseits	
BMZ	Basalmembranzone	
BP	Bullöses Pemphigoid	<i>Bullous Pemphigoid</i>
BP180	180 kDa schweres Bullöses Pemphigoid Antigen	
BP180-C1	Aa 1048-1465 des BP180	
BP180-ex	Aa 486-1497 des BP180	
BP180-N1	Aa 490-812 des BP180	
BP230	230 kDa schweres Bullöses Pemphigoid Antigen	
BP230-C1	Aa 1881-2649 des BP230	
BP230-N	Aa 1-1307 des BP230	
BPAG1	Bullöses Pemphigoid Antigen 1, entspricht BP230	<i>Bullous Pemphigoid antigen 1</i>
BPAG2	Bullöses Pemphigoid Antigen 2, entspricht BP180	<i>Bullous Pemphigoid antigen 2</i>
bspw.	Beispielsweise	
BVES	Baculovirus-Expressionssystem	<i>Baculovirus Expression Vector System</i>
bzw.	Beziehungsweise	
C3	C3-Komplement, Bestandteil des Komplementsystems	<i>Complement component 3</i>
ca.	Circa	<i>Cluster of differentiaiton 4</i>
CD4	Differenzierungsantigen 4	
CD8	Differenzierungsantigen 8	<i>Cluster of differentiaiton 8</i>
cDNA	Komplementäre DNA	<i>Complementary DNA</i>
COL1-COL15	Kollagenöse Subdomänen 1-15 (der ECD des BP180)	
C-terminal	Carboxyl-terminal	
d.h.	Das heißt	

DH	Dermatitis herpetiformis	
	Duhring	
DIF	Direkte Immunfluoreszenz	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
EBA	Epidermolysis bullosa acquisita	
ECD	Extrazelluläre Domäne	<i>Extracellular domain</i>
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest	<i>Enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
<i>et al.</i>	Und andere	
GABEB	Generalisierte atrophische benigne Epidermolysis bullosa	
GB	Gelatinase B, Syn. MMP-9	
GST	Glutathion-S-Transferase	
HD	Hemidesmosom	
His	Histidin	
HLA	Humanes Leukozytenantigen	<i>Human leukocyte antigen</i>
ICD	Intrazelluläre Domäne	<i>Intracellular domain</i>
Ig	Immunglobulin	
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz	
IL	Interleukin	
<i>in vitro</i>	Latein: "im Glas"	
<i>in vivo</i>	Latein: "am lebenden Objekt"	
kDa	Kilodalton	
kg	Kilogramm	
KI	Konfidenzintervall	
LAD	Lineare IgA-Dermatose	
li.	Links	
M	Molar	
max.	Maximal	
MHC	Haupthistokompatibilitäts- komplex	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minuten	
ml	Mililiter	
MMP-2	Matrix Metalloproteinase 2	
MMP 9	Matrix Metalloproteinase 9	
MOI		<i>Multiplicity of infection</i>
MW	Mittelwert	
n	Fallzahl	
NaCl	Natriumchlorid	
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat	
NC1-NC16	Nicht-kollagenöse Subdomänen 1-16 (der ECD des BP180)	
NE	Neutrophile Elastase	
neg.	Negativ	
NTA	Nitrilotriessigsäure	<i>Nitrilotriacetic Acid</i>

N-terminal	Aminogruppe tragendes Ende	
OA	Oberarm	
OD	Optische Dichte	
OS	Oberschenkel	
p	Statistische Signifikanz	
pAcGHLT-A	Transfervektor	
pH	(= $-\log(\text{H}^+)$) neg. dekadischer Logarithmus der H^+ -Konzentration	
PIV	Pemphigoid-Index Wert	<i>Pemphigoid-Index-Value</i>
pos.	Positiv	
Pw.	Punktwert	
re.	Rechts	
SD	Standardabweichung	<i>Standard deviation</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat Polyacrylamid- Gelelektrophorese	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SF	Lepidoptera-Insektenzelllinie, hier SF21	<i>Spodoptera frugiperda</i>
s.o.	Siehe oben	
sog.	So genannten	
SSS	Spalthaut	<i>Salt-Split-Skin</i>
s.u.	Siehe unten	
Tab.	Tabelle	
TBS	Bestandteil des Waschpuffers: 0,2 M Tris + 1,5 M NaCl; pH:7,5	
TM	Transmembranöse Domäne	<i>Transmembranous domain</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan	
TTBS	Waschpuffer: TBS mit 0,05% Tween 20	
u.a.	Unter anderem	
UA	Unterarm	
US	Unterschenkel	
vs.	Versus, Latein: "gegenüber"	
z.B.	Zum Beispiel	
z.T.	Zum Teil	
μl	Mikroliter	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Schematischer Aufbau der Epidermis und der Dermis	2
Abb. 1.2	Schematische Darstellung der Basalmembranzzone	5
Abb. 1.3	Schematischer Aufbau des BP180	6
Abb. 1.4	Schematischer Aufbau des BP230	8
Abb. 1.5	Bullöses Pemphigoid	15
Abb. 1.6	Histopathologie	19
Abb. 1.7	Direkte Immunfluoreszenz	21
Abb. 1.8	Schematische Darstellung des ELISA-Prinzips	22
Abb. 3.1	Untersuchte Konstrukte des BP180 und des BP230	39
Abb. 3.2	Verfügbarkeit der Antikörpernachweise gegen die einzelnen Konstrukte innerhalb des Gesamt- und des Subkollektivs	40
Abb. 4.1	Geschlechtsverteilung und Altersverteilung des Gesamtkollektivs	53
Abb. 4.2	Scoreverteilung im Gesamtkollektiv	53
Abb. 4.3	Antikörperreaktivität gegen BP180-ex (n=50 Patienten)	54
Abb. 4.4	Antikörperreaktivität gegen BP180-N1 (n=50 Patienten)	55
Abb. 4.5	Antikörperreaktivität gegen BP230-C1 (n=50 Patienten)	56
Abb. 4.6	Zusammenfassung der statistischen Auswertung des Gesamtkollektivs	57
Abb. 4.7	Geschlechtsverteilung und Altersverteilung des Subkollektivs	59
Abb. 4.8	Scoreverteilung im Subkollektivs	59
Abb. 4.9	Antikörperreaktivität gegen BP180-ex (n=20 Patienten)	61
Abb. 4.10	Antikörperreaktivität gegen BP180-N1 (n=20 Patienten)	61
Abb. 4.11	Antikörperreaktivität gegen BP180-C1 (n=20 Patienten)	62
Abb. 4.12	Antikörperreaktivität gegen BP230-N (n=20 Patienten)	63
Abb. 4.13	Antikörperreaktivität gegen BP230-C1 (n=20 Patienten)	64
Abb. 4.14	Zusammenfassung der statistischen Auswertung des Subkollektivs	65
Abb. 4.15	Darstellung der Korrelation von PIV und Score für die Einzelkonstrukte im Subkollektiv	70
Abb. 4.16	Therapieverlauf	72

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Übersicht bullöser Autoimmundermatosen	2
Tab. 1.2	Differentialdiagnosen der wichtigsten subepidermalen blasenbildenden Autoimmundermatosen	23
Tab. 3.1	Zusammenfassende Darstellung der Berechnung des Scores	34
Tab. 3.2	Interpretationsfestlegung abweichender Beschreibungen der Lokalisation, Quantität und Qualität der Effloreszenzen	35
Tab. 3.3	Berechnung des Scores für Patient 1	36
Tab. 3.4	Berechnung des Scores für Patient 2	37
Tab. 3.5	Berechnung des Scores für Patient 3	38
Tab. 4.1	Berechnung des Scores für das Gesamtkollektiv	48
Tab. 4.2	ELISA-Daten der Patienten 1-20 (Marburg)	50
Tab. 4.3	ELISA-Daten der Patienten 21-50 (Erlangen)	51
Tab. 4.4	Absolute und relative Anzahl der Patienten mit positivem BP180- und/oder BP230- Antikörperrnachweis im Gesamt- und Subkollektiv	51
Tab. 4.5	Epidemiologische Daten des Gesamtkollektivs zu Alter und Geschlecht	52
Tab. 4.6	Antikörperprofil des Gesamtkollektivs (n=50)	58
Tab. 4.7	Antikörperprofil des Subkollektivs I (n=20)	67
Tab. 4.8	Antikörperprofil des Subkollektivs II (n=20)	67
Tab. 4.9	Therapieverläufe	73

1 Einleitung

1.1 Übersicht bullöser Autoimmundermatosen

Beim bullösen Pemphigoid (BP) handelt es sich um eine blasenbildende Autoimmunerkrankung der Haut.

Die Haut (Cutis, Integument) ist das größte Organ des menschlichen Körpers. Ihre Struktur ist komplex und sie erfüllt unterschiedlichste Aufgaben. Zu diesen gehören bspw. der Schutz vor mechanischen, chemisch-toxischen und thermischen Einwirkungen sowie der Schutz vor Wasserverlust und Krankheitserregern. Außerdem besitzt sie die Funktion der Salz- und Temperaturregulation und dient weiterhin u.a. der Sinneswahrnehmung. In ihrer Grundstruktur besteht sie aus den drei Schichten Epidermis, Dermis und Subcutis, die eine funktionelle Einheit bilden.

Entscheidend für die Kohärenz und Stabilität der Haut sind dabei zum einen die Desmosomen, die als plaqueartige Strukturen der interzellulären Adhäsion der Zellen der Epidermis dienen, zum anderen die Basalmembranzone (BMZ), die die Epidermis mit der Dermis verbindet (Abbildung 1.1).

Sowohl die Desmosomen als auch die BMZ bestehen aus zahlreichen interagierenden Adhäsionsmolekülen, die bei verschiedenen blasenbildenden Autoimmundermatosen als Autoantigene fungieren können. Über die Bindung zirkulierender Autoantikörper kommt es dabei letztendlich über eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen zu einem Adhäsionsverlust der interagierenden Proteine und infolgedessen zur Blasenbildung.

Anhand der Lokalisation des Autoantigens kann zwischen intraepidermalen und subepidermalen blasenbildenden Erkrankungen unterschieden werden: Findet die Antigen-Antikörper-Reaktion im Bereich der Desmosomen (Abbildung 1.1 A) statt, resultiert eine intraepidermale Blasenbildung (Georgi *et al.*, 2001; Hertl *et al.*, 2002a). Häufigster Vertreter dieser Krankheitsgruppe ist der Pemphigus. Befindet sich das Autoantigen im Bereich einer der Komponenten der BMZ, bspw. innerhalb der Hemidesmosomen (Abbildung 1.1 B), so entsteht eine subepidermale Blasenbildung, wie sie für das bullöse Pemphigoid typisch ist.

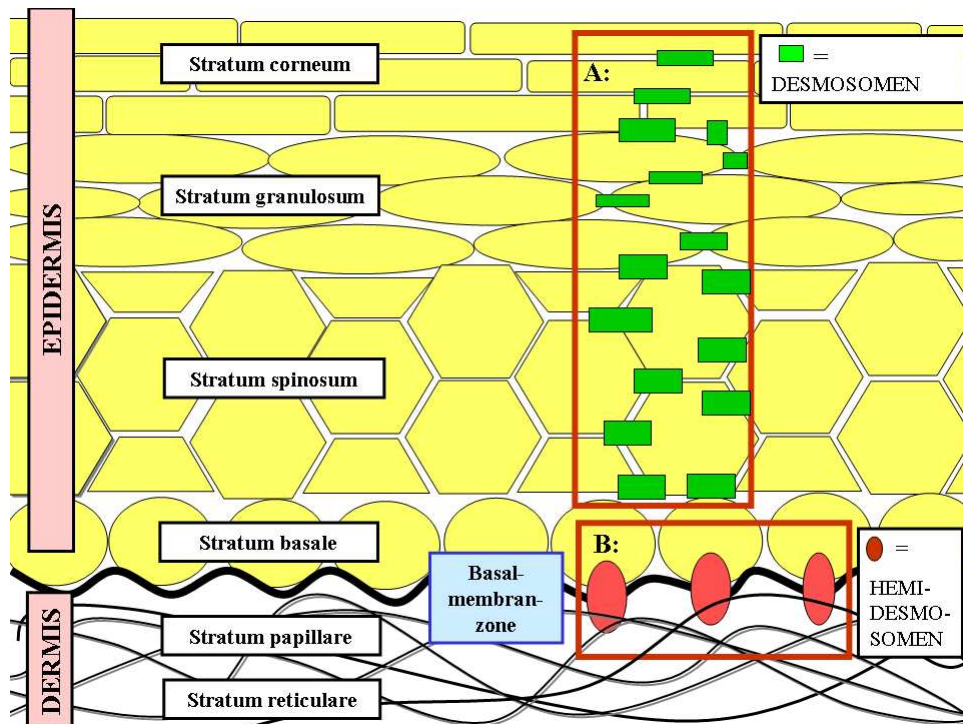


Abb.1.1: Schematischer Aufbau der Epidermis und der Dermis: Ausschnittsweise dargestellt sind die Lokalisationen der Desmosomen (A) und der Hemidesmosomen/Basalmembranzzone (B).

Insgesamt bilden die blasenbildenden Autoimmunerkrankungen eine recht heterogene Gruppe. Die Klassifizierungen sind momentan teils noch uneinheitlich, da sie im Wesentlichen auf klinischen Beobachtungen beruhen, die wiederum für verschiedene Krankheitsbilder Überschneidungen bieten. Aufgrund der fortschreitenden Antigendifferenzierungen werden bullöse Dermatosen vermutlich zukünftig weiter untergliedert bzw. in neue Gruppen zusammengefasst. Eine derzeitige Übersicht gibt folgende Auflistung (Hertl *et al.*, 2002a):

Tab. 1.1: Übersicht bullöser Autoimmundermatosen

<p>Intraepidermaler Adhäsionsverlust (→Desmosomen):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pemphigus vulgaris • Pemphigus foliaceus • Paraneoplastischer Pemphigus • Arzneimittelinduzierter Pemphigus • IgA-Pemphigus 	<p>Subepidermaler Adhäsionsverlust (→ BMZ/Hemidesmosomen):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pemphigoid <ul style="list-style-type: none"> ○ Bullöses Pemphigoid ○ Pemphigoid gestationis ○ Vernarbendes Schleimhautpemphigoid ○ Sehr seltene Varianten • Epidermolysis bullosa acquisita • Lineare IgA-Dermatose • Dermatitis herpetiformis Duhring
--	--

1.2 Definition des bullösen Pemphigoids

Beim bullösen Pemphigoid handelt es sich um die häufigste erworbene blasenbildende Autoimmunerkrankung des Erwachsenenalters, die organspezifisch die Haut befällt. Der Verlauf ist chronisch entzündlich und geht klassischerweise mit zirkulierenden und gewebsgebundenen Autoantikörpern einher. Diese richten sich gegen die hemidesmosomalen Strukturproteine BP180 und BP230, die Bestandteil der BMZ der Haut sind. Die Antigen-Antikörper-Bindung führt über eine Reihe von Mechanismen, u.a. durch die Aktivierung des Komplementsystems, zu einer Infiltration von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Mastzellen und Monozyten bzw. Makrophagen, die proteolytische Enzyme sezernieren. Durch deren destruiende Wirkung kommt es zu einem Adhäsionsverlust von Epidermis und Dermis im Bereich der Lamina lucida der BMZ und infolgedessen zu einer subepidermalen Blasenbildung. Als Begleitbefund besteht ein Entzündungszellinfiltrat der oberen Dermis und der Blasenflüssigkeit (Jordon *et al.*, 1967). Klinisch imponieren pralle Blasen auf normaler oder erythematöser Haut, die ohne Narbenbildung abheilen (Lever 1953; Hertl *et al.*, 2002b). Ein Mundschleimhautbefall tritt in 10 bis maximal 30% der Fälle auf, ein Befall der übrigen Schleimhäute weitaus seltener. Auch hier ist die narbenlose Abheilung die Regel.

1.3 Historie

Die Beschreibung blasenbildender Hauterkrankungen war im Lauf der Zeit sehr vielfältig. Zu Beginn des 18ten Jahrhunderts trat der Begriff des Pemphigus auf und fand fortan für verschiedenste Formen blasiger Effloreszenzen Verwendung. Erst 1953 wurde das BP durch Lever als eigenständige Krankheit beschrieben (Lever 1953). Während Jordon *et al.* 1967 die Assoziation der Blasenbildung zu zirkulierenden und gewebsgebundenen Antikörpern erkannten, konnten Labib *et al.* 1986 erstmals eine Autoreaktivität gegen u.a. ein 180 kDa schweres epidermales Antigen demonstrieren (Jordon *et al.*, 1967; Labib *et al.*, 1986). Mittlerweile wurden Zielantigene identifiziert und charakterisiert. Mit Hilfe von Tiermodellen und mittels verschiedenster Labortests

nähert man sich immer mehr auf molekularer Ebene dem vollständigen Verständnis der Erkrankung.

1.4 Epidemiologie

Mit einer Inzidenz von 6 bis 43 Neuerkrankungen/ 1.000.000 Einwohner/ Jahr ist das BP die häufigste blasenbildende Autoimmunerkrankung des Erwachsenenalters (Bernard *et al.*, 1995; Zillikens *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1999; Gudi *et al.*, 2005; Joly 2008; Langan *et al.*, 2008). Interessanterweise ließ sich ein deutlicher Anstieg der Inzidenzen innerhalb der letzten Jahre verzeichnen, der vermutlich auf die demographische Entwicklung der Bevölkerung zurückzuführen ist (Joly 2008; Langan *et al.*, 2008). Die Erkrankung manifestiert sich meist nach dem 60. Lebensjahr mit einem Median von 80 Jahren, wobei der Anteil der Frauen mit ca. 60% der Fälle überwiegt (Langan *et al.*, 2008). Dabei wächst die Erkrankungshäufigkeit mit zunehmendem Alter stark an. So wiesen Langan *et al.* eine adjustierte Inzidenz von mehr als 400 Neuerkrankungen/ 1.000.000 Einwohner/ Jahr für die über 80-jährige Bevölkerung in Großbritannien nach (Langan *et al.*, 2008). Auch wenn es sich vornehmlich um eine Erkrankung des höheren Alters handelt, wurden einzelne Erkrankungsfälle im Kindesalter beschrieben (Nemeth *et al.*, 1991; Trueb *et al.*, 1999).

1.5 Pathogenese des bullösen Pemphigoids

Im diesem Kapitel soll nun die Pathogenese des BP erläutert werden, um nachfolgend die diagnostischen Befunde und das klinische Bild verstehen zu können.

Die Blasenbildung findet subepidermal statt. Die Antigene, gegen die sich die zirkulierenden Autoantikörper richten, sind die beiden in der BMZ lokalisierten Strukturproteine **BP180** (Kollagen XVII oder BPAG2) und **BP230** (BPAG1) (Labib *et al.*, 1986; Stanley *et al.*, 1988; Giudice *et al.*, 1992). Da die BMZ somit entscheidend in die Antigen-Antikörper-Reaktionen involviert ist, ist es wichtig, ihren strukturellen Aufbau und ihre Funktion zu kennen.

1.5.1 Struktur und Funktion der Basalmembranzzone

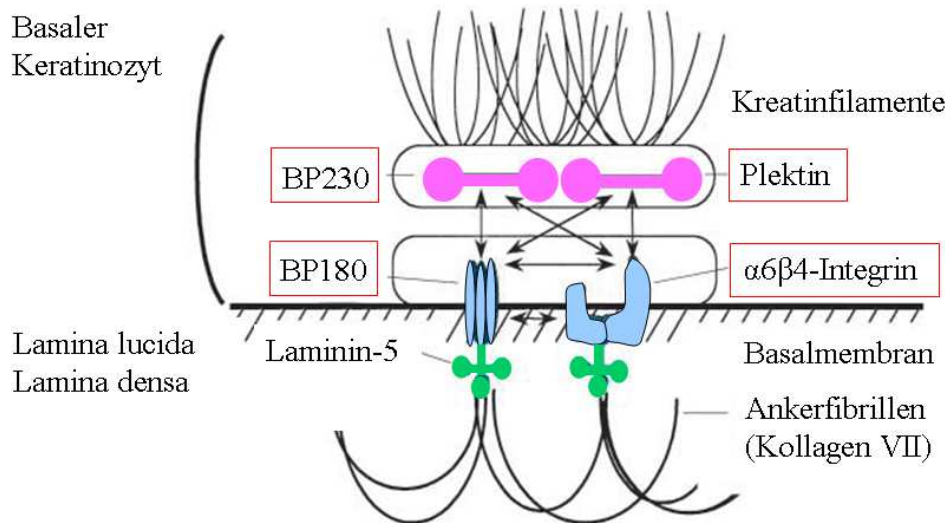


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Basalmembranzzone:
Lage der wesentlichen Strukturproteine sowie deren Interaktionen;
rot markiert: Strukturproteine der Hemidesmosomen
(modifiziert nach: Hertl *et al.*, 2002b, Abb. 4)

Die BMZ (Abbildung 1.2) setzt sich aus vier elektronenmikroskopisch differenzierbaren Bereichen zusammen: den Hemidesmosomen, der Lamina lucida, der Lamina densa und den Ankerfibrillen der oberen Dermis.

Die Hemidesmosomen (HD) sind plaqueartige Strukturen, die an dem dermalen Pol basaler Keratinozyten lokalisiert sind und als funktionale Komplexe der Verankerung des cytoplasmatischen Intermediärfilamentsystems in der extrazellulären Matrix dienen. Dabei interagieren verschiedene hemidesmosomale Strukturproteine - u.a. BP180 und BP230 - auf komplexe Weise, um die Koherenz von Epidermis und Dermis zu gewährleisten (Hopkinson *et al.*, 1995; Borradori *et al.*, 1999; Koster *et al.*, 2003; Powell *et al.*, 2005): So verankern die intrazellulären Proteine BP230 und Plektin, die beide zur Plakin-Familie gehören, über ihr C-terminales Ende die ebenfalls intrazellulär gelegenen Keratinfilamente 5 und 14 in den HD. Zur basalen Seite hin sind BP230 und Plektin N-terminal jeweils mit den intrazellulären Domänen der beiden ebenfalls miteinander in Verbindung stehenden Transmembranproteine BP180 und $\alpha6\beta4$ -Integrin assoziiert. Diese überspannen ihrerseits jeweils mit ihren extrazellulären Domänen die 44-55 nm breite Lamina lucida, um in der Lamina densa zu inserieren. Dabei übernimmt die große zytoplasmatische Domäne der β -Untereinheit des $\alpha6\beta4$ -Integrins die intrazellulären Bindungen an BP230, Plektin und die intrazelluläre Domäne des BP180, wohingegen die α -Untereinheit mit der extrazellulären Domäne des BP180

interagiert. In der Lamina densa besteht für BP180 und $\alpha 6\beta 4$ -Integrin über Laminin 5 die Verbindung zu den dermalen Ankerfibrillen, die vor allem aus Kollagen VII bestehen. Diese wiederum interagieren mit den interstitiellen dermalen Kollagenfaserbündeln.

Die BMZ ist somit unverzichtbar für die Adhäsion von Epidermis und Dermis. Mutationen in den verschiedenen genannten Komponenten oder Antikörperreaktionen gegen diese Strukturen führen zu einem Adhäsionsverlust im Bereich der BMZ und damit zu einer subepidermalen Blasenbildung (Georgi *et al.*, 2001; Hertl *et al.*, 2002b; Zillikens 2002; Koster *et al.*, 2003).

1.5.2 Das Zielantigen BP180

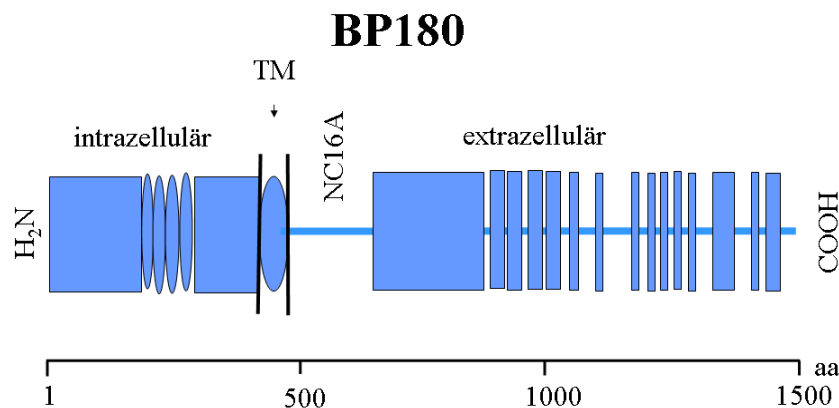


Abb. 1.3: Schematischer Aufbau des BP180

TM: transmembranöse Domäne (modifiziert nach: Thoma-Uszynski *et al.*, 2006, Abb. 1)

BP180 stellt eins der beiden zentralen Autoantigene des BP dar. Es handelt sich hierbei um eine transmembrane Komponente der Hemidesmosomen. Autoantikörper gegen dieses Strukturprotein finden sich auch bei Patienten, die an Pemphigoid gestationis (Herpes gestationis), vernarbendem Pemphigoid, linearer IgA-Dermatose, Lichen planus pemphigoides oder Prurigo nodularis erkrankt sind (Morrison *et al.*, 1988; Bernard *et al.*, 1992; Tamada *et al.*, 1995; Zone *et al.*, 1998; Powell *et al.*, 2005).

Das BP180-Gen (COL17A) ist auf dem langen Arm des Chromosoms 10 (locus 10q24.3) lokalisiert und damit unabhängig von dem des BP230 (s.u.) (Li *et al.*, 1991). Eine Mutation des Gens verursacht die klinische Variante der Epidermolysis bullosa junctionalis Typ Non-Herlitz (GABEB: generalisierte atrophische benigne

Epidermolysis bullosa), eine angeborene Erkrankung, die durch Fragilität der Haut und Blasenbildung gekennzeichnet ist (Jonkman *et al.*, 1995; Mc Grath *et al.*, 1995).

Das 180 kDa schwere Glycoprotein BP180 ist ein Transmembranprotein der Gruppe II (Powell *et al.*, 2005). Als Homotrimer besteht es aus drei identischen Ketten, die je 1497 Aminosäuren (AS) umfassen. Dabei lassen sich folgende Bereiche unterscheiden (Abbildung 1.3): Eine intrazelluläre Domäne (ICD), eine transmembranöse und eine extrazelluläre Domäne (ECD). Die 466 AS umfassende ICD bildet den N-terminalen Anteil und ist globulär formiert. Es folgt der 23 AS umfassende lipophile transmembranöse Bereich, der die Zellmembran durchzieht und in die ECD übergeht. Diese überspannt stabförmig mit ihren 1008 AS die Lamina lucida und inseriert C-terminal mittels eines flexiblen Endstücks in der Lamina densa (Nonaka *et al.*, 2000; Powell *et al.*, 2005).

Der große extrazelluläre Bereich besteht aus 15 kollagenösen Subdomänen (COL1-COL15), die jeweils von einer der nicht-kollagenösen Subdomäne (NC1-NC16) unterbrochen werden (Giudice *et al.*, 1992; Hopkinson *et al.*, 1992). Zellmembrannah liegt die größte dieser nicht-kollagenösen Domänen, die als NC16A-Domäne (AA 489-566) bezeichnet wird. Gegen sie weist die große Mehrzahl der Patientenseren eine Antikörperreaktivität auf (Zillikens *et al.*, 1997; Hofmann *et al.*, 2002; Thoma-Uszynski *et al.*, 2006; Di Zenzo *et al.*, 2008). Wegweisend für diese Erkenntnis war ein von Liu *et al.* 1993 etabliertes Mausmodell, bei dem Kaninchen mit dem extrazellulären Segment des murinen BP180, das zur humanen NC16A-Domäne homolog ist, immunisiert wurden, was der Gewinnung von Antikörpern gegen dieses Segment diente (Liu *et al.*, 1993). Der passive Transfer dieser Antikörper in neugeborene Mäuse führte zu einer subepidermalen Blasenbildung, die klinisch der des BP entsprach. Dies ließ darauf schließen, dass es sich bei der NC16A-Domäne um eine immundominante Region des BP180 handelt. In einem weiteren Tiermodell mit humanisiertem Autoantigen konnte die Rolle der NC16A-Antikörper untermauert werden (Nishie *et al.*, 2007): Nach der Injektion humaner, gegen die NC16A-Domäne gerichteter Antikörper in transgene Mäuse, die statt des murinen BP180 das humane BP180 ortholog exprimierten, resultierte eine BP-typische Blasenbildung.

Darüber hinaus wurden weiter sowohl extra- als auch intrazellulär gelegene Bereiche des BP180 identifiziert, gegen die sich in unterschiedlicher Häufigkeit Autoantikörper detektieren lassen. Bezüglich der Lokalisation dieser weiteren Epitope konnten verschiedene Studien Autoantikörperreaktivitäten gegen C-terminale Sequenzen der

ECD in ca. 20 bis ca. 75% der Fälle nachweisen (Nakatani *et al.*, 1998; Hofmann *et al.*, 2002; Thoma-Uszynski *et al.*, 2006; Di Zenzo *et al.*, 2008). Und auch im mittleren Bereich der ECD (Thoma-Uszynski *et al.*, 2006; Di Zenzo *et al.*, 2008) sowie innerhalb der ICD (Perriard *et al.*, 1999; Di Zenzo *et al.*, 2004; Di Zenzo *et al.*, 2008) ließen sich in bis zu über 50% der Fälle immunreaktive Epitope detektieren. In Übereinstimmung hierzu zeigten 96% aller getesteten Seren einer multizentrischen Studie eine Antikörperreaktivität gegen zusätzliche, außerhalb der NC16A-Domäne gelegene Epitope der ECD des BP180 (Di Zenzo *et al.*, 2008). Insgesamt geht aus den zahlreichen Studien deutlich hervor, dass auf dem Zielantigen BP180 individuell zahlreiche Epitope präsentiert werden können, gegen die sich Autoantikörper entsprechend in unterschiedlicher Häufigkeit nachweisen lassen.

1.5.3 Das Zielantigen BP230

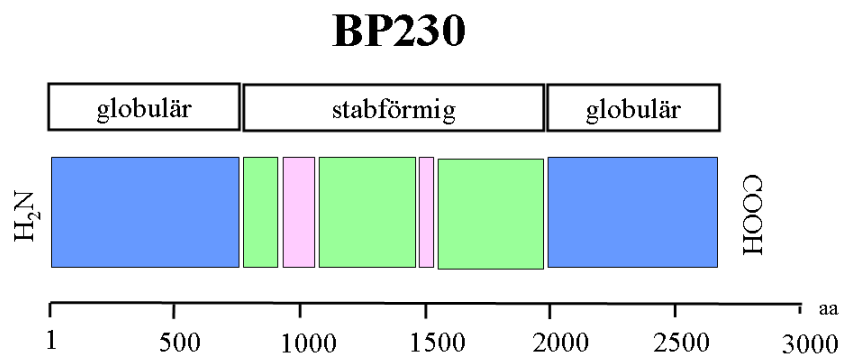


Abb. 1.4: Schematischer Aufbau des BP230
(modifiziert nach: Thoma-Uszynski *et al.*, 2006, Abb. 2)

Das auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (locus 6p11-6p12) kodierte, 230 kDa schwere und 2649 Aminosäuren umfassende Protein BP230 liegt intrazellulär vor (Stanley *et al.*, 1988; Sawamura *et al.*, 1990). Der zentrale stabförmige Bereich wird beidseits von je einer globulären Enddomäne flankiert (Abbildung 1.4). Zu der Familie der Plakine gehörend, dient es als Komponente der Hemidesmosomen (siehe 1.5.1) der Verankerung von Keratinfilamenten an der Basalseite der Keratinozyten (Sawamura *et al.*, 1991; Ruhrberg *et al.*, 1997; Borradori *et al.*, 1999; Koster *et al.*, 2003).

Bislang konnte die Pathogenität der BP230 Antikörper noch nicht eindeutig nachgewiesen werden: In einem Tiermodell wurden Kaninchen-Antikörper gegen eine Peptidsequenz des humanen BP230 generiert (Kiss *et al.*, 2005). Deren passiver

Transfer in neonatale Mäuse führte nur im Einzelfall zu einer Blasenbildung, histologisch und immunhistologisch ließen sich allerdings lineare IgG- und C3-Ablagerungen, subepidermale Blasenformationen sowie Entzündungszellinfiltrate detektieren, wie sie für das BP typisch sind.

Analog zu BP180 konnten auch auf dem Zielantigen BP230 unterschiedliche immunreaktive Epitope identifiziert werden: So wiesen verschiedene Arbeitsgruppen sowohl für C-terminale als auch für N-terminale Sequenzen Autoantikörper nach (Gaucherand *et al.*, 1995; Skaria *et al.*, 2000; Thoma-Uszynski *et al.*, 2004; Thoma-Uszynski *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2006; Di Zenzo *et al.*, 2008).

1.5.4 „Epitope Spreading“

Aufgrund des Vorkommens verschiedener Epitope innerhalb des BP180 und angesichts der Tatsache, dass mit dem BP230 ein zweites, genetisch gesehen unabhängiges Autoantigen mit ebenfalls mehreren Epitopen vorliegt, stellt sich die Frage, wie es zu dieser Vielfalt von Epitopen kommen kann. Eine gängige Theorie ist die des sog. „Epitope Spreading“. Diese wurde von Vanderlugt and Miller als im Rahmen einer chronischen Autoimmunerkrankung oder Entzündungsreaktion sekundär auftretende spezifische Immunantwort autoreaktiver B-und/oder T-Lymphozyten gegen endogene Epitope beschrieben, die sich bezüglich des immundominanten Epitops unterscheiden, mit diesem nicht kreuzreagieren und auf demselben oder einem anderen Protein liegen können (Vanderlugt, C. J. *et al.*, 1996). Das heißt, dass im Laufe eines autoimmunen oder entzündlichen Prozesses ein derartiger Gewebsschaden entsteht, dass bestimmte Proteinbestandteile, die unter normalen Bedingungen für das Immunsystem unzugänglich sind, demaskiert werden und dadurch antigenes Potential entwickeln. Dies führt zu einer sekundären Autoimmunantwort und damit zu einem Fortschreiten der Erkrankung (Vanderlugt, C. J. *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1998).

Für das BP bedeutet dies, dass die extrazelluläre Domäne des BP180 vermutlich initial die entscheidenden Autoantigene präsentiert, und sich erst sekundär im Krankheitsverlauf über Demaskierungsprozesse Antikörperreaktivitäten gegen intrazelluläre Epitope des BP180 (im Sinne eines intramolekularen „epitope spreading“) bzw. gegen das intrazellulär lokalisierte BP230 (im Sinne eines intermolekularen „epitope spreading“) entwickeln. Dies führt wahrscheinlich letztendlich zu der Vielfalt

der Epitope und dem individuellen Befallsmuster beim BP. Bezüglich der Initialreaktion wurde der NC16A-Region im Rahmen dieser Theorie von zahlreichen Autoren auf der Grundlage verschiedener Tiermodelle (Liu *et al.*, 1993) und *in vitro* Untersuchungen (Sitaru *et al.*, 2002) sowie anhand serologischer Tests und klinischer Beobachtungen (Amo *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2002; Thoma-Uszynski *et al.*, 2006) besondere Bedeutung beigemessen.

Das Modell des Epitope Spreading scheint bei zahlreichen Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise der Multiplen Sklerose, dem Diabetes mellitus Typ I und der Myasthenia gravis eine Rolle zu spielen (Vanderlugt, C. L. *et al.*, 2002).

1.5.5 Komponenten der Pathogenese

Beim BP handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung. Das Immunsystem des Menschen ist im physiologischen Zustand permanent damit beschäftigt, körpereigene von körperfremden Strukturen zu unterscheiden. Wird eine Substanz als körperfremd erkannt, wird eine Immunreaktion in Gang gesetzt mit dem Ziel, diese Substanz zu eliminieren und somit den Organismus zu schützen. Die Immunreaktionen werden dabei über das spezifische und das unspezifische Immunsystem vermittelt. Das spezifische System setzt sich aus der zellulären Komponente der T-Lymphozyten und der humoralen Komponente der von B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen sezernierten Antikörper zusammen. Das unspezifische Abwehrsystem besteht vor allem aus Neutrophilen, Mastzellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und dem Komplementsystem. Die Trennung in beide Systeme ist unscharf, da sie funktionell über komplexe Mechanismen eng zusammenarbeiten. Kommt die Selbsttoleranz des Körpers aus dem Gleichgewicht, entstehen Autoimmunerkrankungen. Bei der Pathogenese des BP spielen alle oben genannten Immunkomponenten eine Rolle. Es handelt sich um eine T- und B- Zell vermittelte, antikörperabhängige Autoimmunerkrankung.

1.5.5.1 Vom Autoantigen zur Autoantikörper-Produktion

Autoreaktive T-Zellen scheinen eine entscheidende Rolle für die Aktivierung autoreaktiver B-Zellen mit deren Produktion pathogener Antikörper gegen BP180 und

BP230 zu spielen (Budinger *et al.*, 1998; Eming *et al.*, 2000; Hertl 2000; Hertl *et al.*, 2006). T-Lymphozyten erkennen Antigene nur in Assoziation mit einem autologen HLA-Produkt (human leukocyte antigen; entspricht MHC: major histocompatibility complex) das ihnen von einer antigenpräsentierenden Zelle (u.a. dendritische Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten) präsentiert wird. Jeder Mensch hat, beruhend auf seiner genetischen Grundlage, ein individuelles HLA-Muster im Sinne einer immungenetischen Veranlagung. Bekannt ist, dass das HLA-Klasse-II-Allel *HLA-DQB1*0301* mit bullösen Autoimmundermatosen - u.a. dem Krankheitsbild des BP - assoziiert ist (Delgado *et al.*, 1996; Budinger *et al.*, 1998).

Es lassen sich 2 Hauptgruppen der T-Lymphozyten unterscheiden:

→ CD4-positive T-Zellen:

Sie erkennen an MHC-Klasse-II gebundene Antigene und lassen sich weiter unterteilen in:

- Th1-Zellen: Sie produzieren u.a. die Zytokine Interleukin 2, Tumornekrosefaktor- α und Interferon- γ . Zu ihren Hauptaufgaben gehören die Stimulation von Makrophagen zwecks des Abbaus phagozytierter Bakterien sowie die Steigerung der Proliferation zytotoxischer CD8-positiver T-Lymphozyten. Des Weiteren regulieren sie die IgG1- und IgG2-Sekretion (Romagnani 1992).
- Th2-Zellen: Sie produzieren u.a. die Zytokine IL-3,-4,-5,-6,-10 und -13. Ihnen kommt besondere Bedeutung in der B-Zell-Stimulation zur antikörperproduzierenden Plasmazelle sowie dem „isotype switching“ der Immunglobuline zu. Daher werden sie auch T-Helfer-Zellen genannt. Darüber hinaus regulieren sie die IgG4- und IgE-Sekretion (Romagnani 1992).

→ CD8-positive T-Zellen:

Sie erkennen an MHC-Klasse-I gebundene Antigene und wirken über enzymatische Lysemechanismen zytotoxisch auf Zellen, die mit Viren, Bakterien und z.T. Protozoen infiziert sind. Außerdem können sie Apoptose in Zielzellen (z.B. in Tumorzellen) induzieren.

Für die Krankheitsinduktion des BP sind vermutlich autoreaktive CD4-positive T-Zellen verantwortlich, die fälschlicherweise körpereigene Proteinsequenzen des BP180 bzw. des BP230 nicht als *eigen*, sondern als *fremd* erkennen und folglich B-Lymphozyten zur Autoantikörper-Produktion gegen diese Epitope stimulieren (Budinger *et al.*, 1998; Eming *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000; Hertl *et al.*, 2006; Thoma-Uszynski *et al.*, 2006). Diese Stimulation erfolgt u.a. mittels der Freisetzung bestimmter Zytokinmuster, die im Falle des BP sowohl aus den oben genannten Th1-typischen als auch den Th2-typischen Zytokinen bestehen (Budinger *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2000). Auch bei phänotypisch gesunden Testpersonen, die Träger des *HLA-DQB1*0301* – Allels waren, konnte eine BP180-spezifische T-Zellantwort gefunden werden. Dabei zeigte sich, dass eine kombinierte Th1/Th2-Antwort vermehrt in Assoziation mit der Erkrankung auftrat, wohingegen eine selektive bzw. überwiegende Th1-Antwort bei gesunden Individuen detektiert wurde (Budinger *et al.*, 1998; Eming *et al.*, 2000). Dies lässt darauf schließen, dass es in der Pathogenese des BP vermutlich zu einer Dysregulation der Th1- und Th2-Antwort kommt.

Über die Prozesse der T-Zell-Aktivierung und Zytokinfreisetzung werden B-Zellen stimuliert und differenzieren sich so zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. Thoma-Uszynski *et al.* konnten zeigen, dass die autoreaktiven T-Zellen und die Autoantikörper der Plasmazellen hierbei gegen ähnliche oder identische Epitope des BP180 und z.T. auch des BP230 gerichtet sind (Thoma-Uszynski *et al.*, 2006). Die von den Plasmazellen produzierten BP180- und BP230-Immunglobuline gehören hauptsächlich den Klassen IgG1 und IgG4 an, seltener wurden IgA und IgE gefunden (Bernard *et al.*, 1990a; Döpp *et al.*, 2000; Laffitte *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 2002; Thoma-Uszynski *et al.*, 2004; Di Zenzo *et al.*, 2008). Das Verhältnis der BP180-spezifischen IgG1- zur IgG4-Antwort wird dabei kontrovers diskutiert: So lassen sich Studien finden, die ein ausgeglichenes Verhältnis der beiden IgG-Subklassen postulieren (Eming *et al.*, 2000; Thoma-Uszynski *et al.*, 2004), wohingegen Hofmann *et al.* eine IgG1-Dominanz akut erkrankter Patienten gegenüber einer IgG4-Dominanz in Remission befindlicher Patienten nachwies (Hofmann *et al.*, 2002). Die Ergebnisse der Arbeitsgruppen um Laffitte und Bernard, die ebenfalls ein Überwiegen der IgG1- gegenüber der IgG4-Subtypen beschrieben hatten, fanden somit Bestätigung (Bernard *et al.*, 1990a; Laffitte *et al.*, 2001). Die Tatsache, dass sich zum einen in periläsionalem Gewebe meistens C3 nachweisen lässt, und zum anderen tierexperimentell die Notwendigkeit des

Komplementsystems für die Blasenbildung verifiziert werden konnte, spricht für die Relevanz des komplementfixierenden IgG1 in der Initialphase des BP (Jordon *et al.*, 1967; Bernard *et al.*, 1990a; Liu *et al.*, 1995; Hertl 2000; Thoma-Uszynski *et al.*, 2004).

1.5.5.2 Vom Antigen-Antikörper-Komplex zur Blasenbildung

Liu *et al.* konnten in einem wegweisenden Tiermodell die Relevanz der Autoantikörper in der Pathogenese des BP zeigen (Liu *et al.*, 1993): In diesem Modell wurden Kaninchen-Antikörper gegen ein Segment des murinen BP180 (mBP180 NC14A) generiert, welches zur menschlichen NC16A-Domäne des BP180 homolog ist. Die so gewonnenen Antikörper induzierten nach passivem Transfer in neonatale Mäuse das klinische Bild des BP. Doch anders als beispielsweise beim Pemphigus vulgaris reicht die Antigen-Antikörper-Reaktion alleine nicht für die Pathogenese des BP aus. Vielmehr ist sie an ein suffizientes Komplementsystem gebunden: So zeigten Komplementsystem-defiziente Mäuse in einem abgewandelten Tiermodell auf den passiven Transfer dieser genannten BP180-Antikörper keine Blasenbildung (Liu *et al.*, 1995). Über die Aktivierung des Komplementsystems werden chemotaktisch wirksame Mediatoren freigesetzt, die beim Menschen zur Einwanderung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Mastzellen und Monozyten bzw. Makrophagen in die BMZ führen. Auch deren Relevanz ließ sich im experimentellen BP unterstreichen (Liu *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass hierbei eine gesteigerte Expression der proinflammatorischen Interleukine 6 und 8 eine Rolle spielt (Schmidt *et al.*, 2000b). Die genannten, in die BMZ einwandernden Zellen setzen proteolytische Enzyme in Form von Granula frei, die somit in den Extrazellulärbereich gelangen: Sowohl in humaner Blasenflüssigkeit als auch in läsionalem und periläsionalem Gewebe erkrankter Patienten ließen sich hohe Konzentrationen u.a. der Neutrophilen Elastase (NE), Gelatinase B (GB, entspricht MMP-9), Cathepsin G, Plasminogenaktivatoren, Plasmin und MMP-2/Gelatinase A nachweisen (Oikarinen *et al.*, 1983; Grando *et al.*, 1989; Kramer *et al.*, 1993; Stahle-Backdahl *et al.*, 1994). Diese führen zu einer Destruktion verschiedener extrazellulärer Matrixproteine - u.a. des extrazellulären Anteils des BP180 - mit daraus resultierendem Kohärenzverlust von Epidermis und Dermis und konsekutiver subepidermaler Blasenbildung (Hertl *et al.*, 2002b). Offensichtlich kommt den beiden Enzymen NE und GB dabei besondere Bedeutung zu: Zum einen konnte experimentell gezeigt werden,

dass sie die extrazelluläre Domäne des rekombinanten BP180 zu spalten vermögen (Stahle-Backdahl *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2000a; Verraes *et al.*, 2001; Shimanovich *et al.*, 2004), zum anderen, dass ihr Fehlen zu einer Resistenz gegenüber experimentellem BP führt (Liu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000a). Des Weiteren ergab sich tierexperimentell, dass der genannte Pathomechanismus zumindest in der Frühphase der Erkrankung an ein intaktes Plasminsystem geknüpft ist, da die aus Neutrophilen freigesetzte GB initial als Proenzym vorliegt, das (u.a.) durch Plasmin in seine aktive Form überführt werden muss (Liu *et al.*, 2005). Erst die aktivierte GB ist in der Lage, den physiologischen NE-Hemmer Alpha-1-Proteinase-Inhibitor (α 1-PI) proteolytisch zu spalten (Liu *et al.*, 2000b). Dadurch liegt die NE ungehemmt vor und kann extrazelluläre Matrixproteine (u.a. die ECD des BP180) destruieren, woraus letztendlich eine Spaltbildung innerhalb der dermo-epidermalen Junctionszone resultiert.

1.6 Klinisches Erscheinungsbild

Das klinische Erscheinungsbild des BP kann vielfältig sein (Hertl *et al.*, 2002c; Di Zenzo *et al.*, 2007). Der klassischen Blasenbildung geht regelmäßig eine nicht-bullöse Prodromalphase voraus. Sie ist gekennzeichnet durch meist starken Juckreiz und exkorierte papulovesikulöse bzw. urtikarielle Plaques. Diese können über Wochen bis Monate anhalten und auch das einzige Zeichen der Erkrankung bleiben. Im blasenbildenden Stadium sind erbsen- bis haselnussgroße pralle Blasen auf normaler oder erythematöser Haut in Kombination mit urtikariellen und infiltrierten Plaques bzw. Papeln das Hauptcharakteristikum (Abbildung 1.5). Gelegentlich entsteht ein anuläres oder figuriertes Muster. Die Effloreszenzen können sowohl lokalisiert als auch generalisiert auftreten, wobei der Befall häufig ein symmetrisches Bild zeigt. Prädilektionsstellen sind die Beugeseiten der Extremitäten, das obere Abdomen und die intertriginösen Areale (Axillen, Inguinalregion). Ein Mundschleimhautbefall wird in 10-30% der Fälle beobachtet, der Befall der übrigen Schleimhäute von Auge, Nase, Pharynx, Ösophagus und Anogenitalbereich tritt wesentlich seltener auf. Da das Blasendach aus der kompletten Epidermis gebildet wird, sind die Blasen prall und relativ stabil. Ihr Inhalt ist meist klar und serös. Kommt es zum Anriss der Kapillaren des oberen Plexus, kann die Blasenflüssigkeit auch hämorrhagisch infiltriert sein. Es

besteht meist eine seitliche Verschiebbarkeit der Blasen, was als positives Nikolski –II-Zeichen bezeichnet wird. Platzen die Blasen, entstehen flache Erosionen, die krustig abheilen und eine Hypo- oder Hyperpigmentierung hinterlassen können. Eine Narbe entsteht klassischerweise nicht.

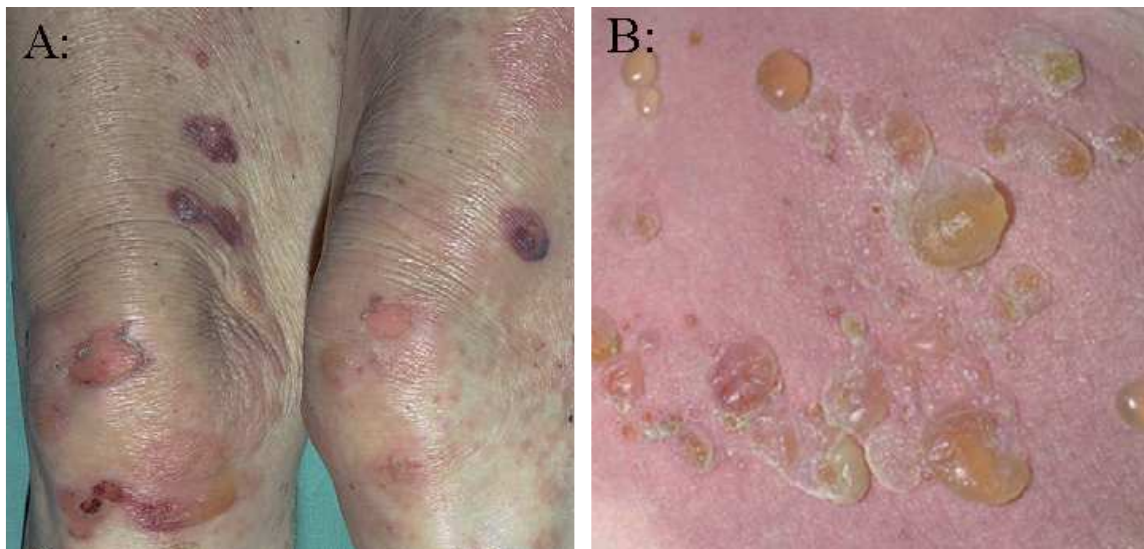


Abb. 1.5 Bullöses Pemphigoid (Di Zenzo *et al.*, 2007, Abb.1):
A: Nebeneinander praller Blasen und flächiger Erosionen
B: Pralle serös gefüllte Blasen auf erythematöser Haut

In der Literatur sind verschiedene Sonderformen des BP beschrieben. Bei der lokalisierten Variante treten die genannten Effloreszenzen beispielsweise nur prätibial, vulvär oder am Kopf auf (Borradori *et al.*, 1992; Farrell *et al.*, 1999; Di Zenzo *et al.*, 2007). Andere Varianten gehen ganz ohne Blasenbildung einher und zeigen stattdessen ekzematöse oder pruriginöse Effloreszenzen.

Des Weiteren ist bekannt, dass das BP durch Traumata, UV-Strahlung, Radiotherapie (Mul *et al.*, 2007) und verschiedene Medikamente wie Diuretika (Furosemid, Aldosteronantagonisten), Analgetika, Neuroleptika (Diazepam) und Penicilline getriggert werden kann (Bastuji-Garin *et al.*, 1996; Vassileva 1998). Darüber hinaus wird eine Assoziation mit Malignomen (Venning *et al.*, 1990), anderen Autoimmunerkrankungen (Taylor *et al.*, 1993), neurologischen Erkrankungen (Laffitte *et al.*, 2005; Stinco *et al.*, 2005) und verschiedenen Dermatosen diskutiert.

1.7 Scores zur Ermittlung der Krankheitsaktivität

Zahlreiche Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der Evaluation der klinischen Krankheitspräsentation bei blasenbildenden Hauterkrankungen mit dem Ziel, den Hautbefund zu quantifizieren und somit inter- bzw. intraindividuelle Vergleiche – bspw. im Therapieverlauf - zu ermöglichen. Die Vorgehensweise dieser Arbeitsgruppen gestaltet sich dabei ganz unterschiedlich. So gibt es in der Literatur sowohl einfach als auch komplex strukturierte Krankheitsaktivitätsscores, die bei blasenbildenden Dermatosen wie dem BP oder dem Pemphigus Anwendung finden. Im Folgenden werden wichtige in der Literatur beschriebene Krankheitsaktivitätsscores erläutert, die allerdings nur einen Auszug aus der Fülle von Evaluationsmöglichkeiten darstellen. Da ein Schleimhautbefall beim BP eine untergeordnete Rolle spielt, liegt das Hauptaugenmerk der folgenden Darstellung auf kutanen Punktesystemen.

Eine Möglichkeit der Evaluation stellt die Schätzung der flächenmäßigen Ausdehnung BP-typischer Effloreszenzen bezogen auf die Gesamtkörperoberfläche des Patienten dar:

- Tsuji-Abe *et al.* (Tsuji-Abe *et al.*, 2005):
In Abhängigkeit von der Ausdehnung des Hautbefalls auf ~20, ~40, ~60 bzw. ~80% der Gesamtkörperoberfläche staffelt sich die Vergabe von 1 bis 4 Punkten.
- Mahajan *et al.* (Mahajan *et al.*, 2005):
Anhand eines Befalls von <10%, 10-25%, 25-50% oder >50% der Gesamtkörperoberfläche werden 1 bis 4 Punkte vergeben.
- Agarwal *et al.* (Agarwal *et al.*, 1998):
Der Befalls der Gesamtkörperoberfläche wird geschätzt und in Gruppen gestaffelt, die folgendermaßen definiert sind: 0-15%, 16-30%, 31-50%, 51-70%, 71-90% und >90%. Anhand der Gruppenzugehörigkeit richtet sich die Vergabe von bis zu maximal 6 Punkten.
- Thoma-Uszynski *et al.* (Thoma-Uszynski *et al.*, 2004; Thoma-Uszynski *et al.*, 2006):
Wenige Blasen, die bis zu 20% der Gesamtkörperoberfläche involvieren, werden als lokalisiertes Krankheitsstadium definiert. Ausgedehnte Blasen, die mehr als 20% der Gesamtkörperoberfläche betreffen, werden als generalisiertes Krankheitsstadium festgesetzt.

Andere Scores orientieren sich an der Anzahl befallener Körperareale, die zuvor definiert wurden:

- Herbst et al. (Herbst et al., 2000):

Hier erfolgt die Einteilung der Körperoberfläche sowie der oralen und genitalen Schleimhaut von an Pemphigus vulgaris erkrankten Patienten in definierte Areale. Aus einer Kombination der Anzahl befallener Areale sowie der erforderlichen Therapie wird ein Punktwert ermittelt.

Wiederum andere Scores beinhalten das Zählen der Effloreszenzen:

- Schmidt et al. und Harman et al. (Schmidt et al., 2000a; Harman et al., 2001):

Anhand der Anzahl der gezählten Blasen bzw. Erosionen werden bis zu 3 Punkte vergeben. So unterteilen Harman et al. den Hautbefund beim Pemphigus in <5, >5 und <20 sowie >20 Erosionen, während Schmidt et al. beim BP eine Einteilung in erscheinungsfrei, 1-10 und > 10 Blasen/ Erosionen vornehmen.

- Agarwal et al. (Agarwal et al., 1998):

Hier wird u.a. die Anzahl der neu aufgetretenen Blasen pro Tag berücksichtigt.

Weiterhin wird eine relative Beurteilung der Krankheitsaktivität im individuellen Krankheitsverlauf beschrieben:

- Kobayashi et al. und Yoshida et al. (Kobayashi et al., 2002; Yoshida et al., 2006):

Die Quantifizierung des Hautbefalls im Verlauf erfolgt für jeden BP-Patienten innerhalb eines Bereichs von 0 bis 4 Scorepunkten, wobei 4 Punkte die maximale Aktivität im individuellen Krankheitsverlauf darstellen.

Abschließend sollen zwei komplexer gestaltete Scores genannt werden. Sie setzen sich jeweils aus mehreren Teilscores zusammen, die einen Gesamtscore ergeben:

- Pfütze et al. (Pfütze et al., 2007):

Der „Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score“ (ABSIS) berücksichtigt sowohl den Haut-, als auch den Schleimhautbefall beim Pemphigus. Die Berechnung erfasst folgende Aspekte:

- Die Evaluation der flächenmäßigen Ausdehnung der Effloreszenzen bezogen auf die Gesamtkörperoberfläche erfolgt anhand der 9er-Regel. Dabei wird die Handfläche des Patienten einem Prozent der Gesamtkörperoberfläche gleichgesetzt. In Abhängigkeit von der Qualität der

Effloreszenzen werden unterschiedliche Gewichtungsfaktoren verwendet, mit welchen der prozentuale Anteil der involvierten Gesamtkörperoberfläche multipliziert wird:

- erosive, exsudative Läsionen/Blasen: Faktor 1,5
 - erosive, trockene Läsionen: Faktor 1,0
 - reepithelialisierte Läsionen Faktor 0,5.
- Die orale Beteiligung wird anhand eines von Saraswat *et al.* beschriebenen zweiteiligen Punktesystems erfasst (Saraswat *et al.*, 2003). Dieses beinhaltet sowohl die anatomische Ausbreitung der Läsionen innerhalb von 11 definierten Arealen der Mundschleimhaut bzw. des Pharynx als auch die Schwere der hierdurch verursachten Symptome bei der Nahrungsaufnahme verschiedener, unterschiedlich konsistenter Speisen und Getränke.
- Di Zenzo *et al.* (Di Zenzo *et al.*, 2008):
Hierbei handelt es sich um einen BP-Score, der sich aus der Summe dreier Einzelscores berechnet. Diesen liegen folgende Gesichtspunkte zugrunde:
 - Einerseits wird die Krankheitsaktivität als Anzahl neu aufgetretener Blasen innerhalb zweier aufeinanderfolgender Tage eruiert:
 - Keine Blasen: 0 Punkte
 - < 3 Blasen: 1 Punkt
 - 3 bis 10 Blasen: 2 Punkte
 - > 10 Blasen: 3 Punkte.
 - Andererseits wird die Krankheitsausdehnung im Sinne der involvierten Gesamtkörperoberfläche berücksichtigt, die mit der oben genannten 9er-Regel erhoben und folgendermaßen berechnet wird:
 - Keine Läsionen: 0 Punkte
 - $\leq 10\%$ der Gesamtkörperoberfläche: 1 Punkt
 - 11 bis 36% der Gesamtkörperoberfläche: 2 Punkte
 - $> 36\%$ der Gesamtkörperoberfläche: 3 Punkte.
 - Auf der Grundlage des subjektiv empfundenen Pruritus erfolgt abschließend die Vergabe folgender Punkte:
 - Kein Pruritus: 0 Punkte
 - Vorhandener Pruritus: 1 Punkt
 - Schlafbeeinträchtigender Pruritus: 2 Punkte.

1.8 Diagnostik

Die Diagnosestellung des BP beruht neben der klinischen Präsentation des Patienten auf histologischen, immunhistologischen (Immunfluoreszenz) und immunsérologischen Untersuchungen (Hertl *et al.*, 2002c; Di Zenzo *et al.*, 2007).

1.8.1 Histologische Untersuchung

Insgesamt dient die Histologie nur der orientierenden Unterscheidung zwischen einer *intra*- und einer *subepidermalen* Blasenbildung (Hertl *et al.*, 2002c). Als Material eignen sich frische Läsionen sowie periläsionales Gewebe. Lichtmikroskopisch imponiert beim BP klassischerweise eine subepidermale Spaltbildung (Abbildung 1.6 A). Da die pathologischen Prozesse im Bereich der BMZ ablaufen, wird die Epidermis als Ganzes in Form einer Blasendecke abgehoben. Elektronenmikroskopisch zeigt sich, dass die Spaltbildung innerhalb der Lamina lucida lokalisiert ist. Im entstehenden Blasenlumen finden sich vor allem Eosinophile, aber auch Neutrophile, Lymphozyten sowie Fibrin. Die obere Dermis ist ödematös und enthält ebenfalls ein Entzündungszellinfiltrat. Auch die lineare IgA-Dermatose (LAD), die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) und die Dermatitis herpetiformis Duhring (DH) weisen das Bild einer subepidermalen Blasenbildung auf. Die Gruppe der Pemphigus-Erkrankungen ist durch einen intraepidermalen Adhäsionsverlust (Akantholyse) gekennzeichnet und lässt sich somit schon lichtmikroskopisch abgrenzen (Abbildung 1.6 B).

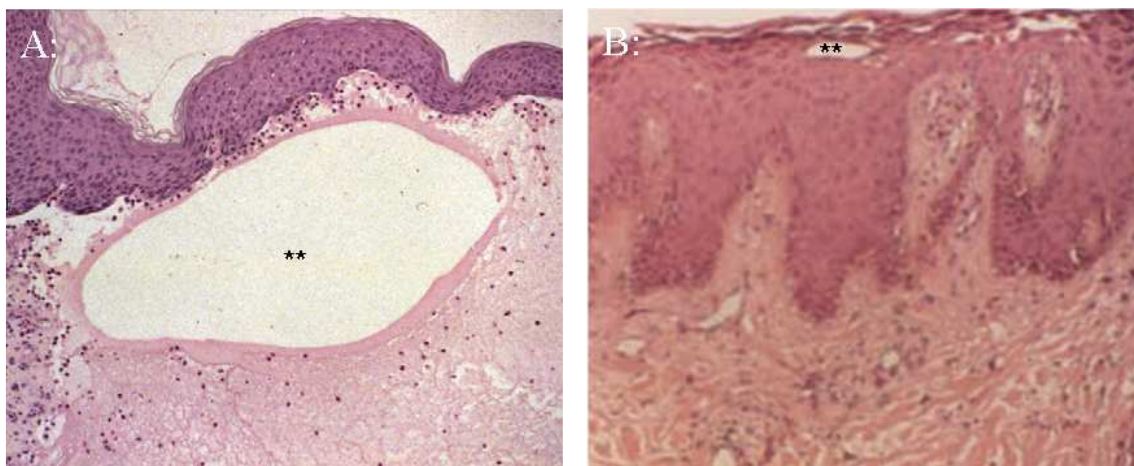


Abb. 1.6: Histopathologie:

** : Markierung der Spaltbildung

A: Subepidermale Spaltbildung beim bullösen Pemphigoid (Di Zenzo *et al.*, 2007, Abb.6A)

B: Intraepidermale Spaltbildung beim Pemphigus foliaceus (Hertl *et al.*, 2002c, Abb.2)

1.8.2 Direkte und indirekte Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz dient der mikroskopischen Darstellung von Antigenen, Antikörpern, Komplementfaktoren und Fibrin mit Hilfe spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper.

Mittels der **direkten Immunfluoreszenz** (DIF) werden gewebsgebundene Antikörper und Komplementfaktoren nachgewiesen. Von dem entnommenen Gewebe müssen hierfür Kryostatschnitte angefertigt werden. Nach der Beschichtung mit fluoreszierenden Anti-IgG, Anti-IgA und/oder Anti-C3 in verschiedenen Verdünnungen wird das Präparat im Dunkeln mikroskopiert. Beim BP imponieren klassischerweise linear angeordnetes IgG und C3 entlang der BMZ (Abbildung 1.7 A), seltener kommt IgA vor (Hertl *et al.*, 2002c; Di Zenzo *et al.*, 2007). Das gleiche Bild zeigt sich bei der EBA sowie in Form einer IgA-Ablagerung bei der LAD. Die DH lässt sich anhand granulärer IgA-Ablagerungen innerhalb der papillären Dermis abgrenzen. Mittels einer artifiziellen Spaltbildung (SSS: Salt-Split-Skin) innerhalb der Lamina lucida mit konsekutiver räumlicher Trennung der Auto-Antigene der BMZ wird die Differenzierung der genannten Dermatosen erleichtert. Dies gelingt, indem die periläsionale Haut im ersten Schritt mit 1M NaCl behandelt wird (Gammon *et al.*, 1992). Die nach Inkubation mit markierten Antikörpern sichtbar werdenden Immunkomplexe befinden sich beim BP an der epidermalen oder der epidermalen *und* dermalen Seite des artifiziellen Spaltes, hingegen bei der EBA und dem vernarbenden anti-Laminin-5-positiven Schleimhautpemphigoid am Blasenboden. Im Fall der LAD imponiert häufiger ein epidermales, in ca. 30 % aber auch ein dermales Fluoreszenzmuster.

Die **indirekte Immunfluoreszenz** (IIF) dient der Untersuchung von Patientenseren auf zirkulierende Antikörper. Als Bindungssubstrat wird humane Spalthaut verwendet, mit der das Patientenserum inkubiert wird. Über die nachfolgende Bindung markierter antihumaner Immunglobuline werden die aus dem Serum stammenden Antikörper sichtbar. Diese befinden sich beim BP wiederum an der epidermalen oder selten an der epidermalen *und* dermalen Seite des artifiziellen Spaltes, während sie bei Patienten mit EBA am Blasenboden detektiert werden können (Gammon *et al.*, 1992). Im Fall der LAD finden sie sich häufiger epidermal als dermal. Handelt es sich um eine DH, zeigt sich typischerweise eine IgA-Reaktivität mit Endomysium glatter Muskelzellen

(Chorzelski *et al.*, 1983). Erkrankungen aus der Gruppe des Pemphigus (Abbildung 1.7 B) differenzieren sich analog ihrer Antikörper-Reaktivität im Bereich der Desmosomen anhand eines interzellulären, netzförmigen Bindungsmusters innerhalb der Epidermis (Hertl *et al.*, 2002c).

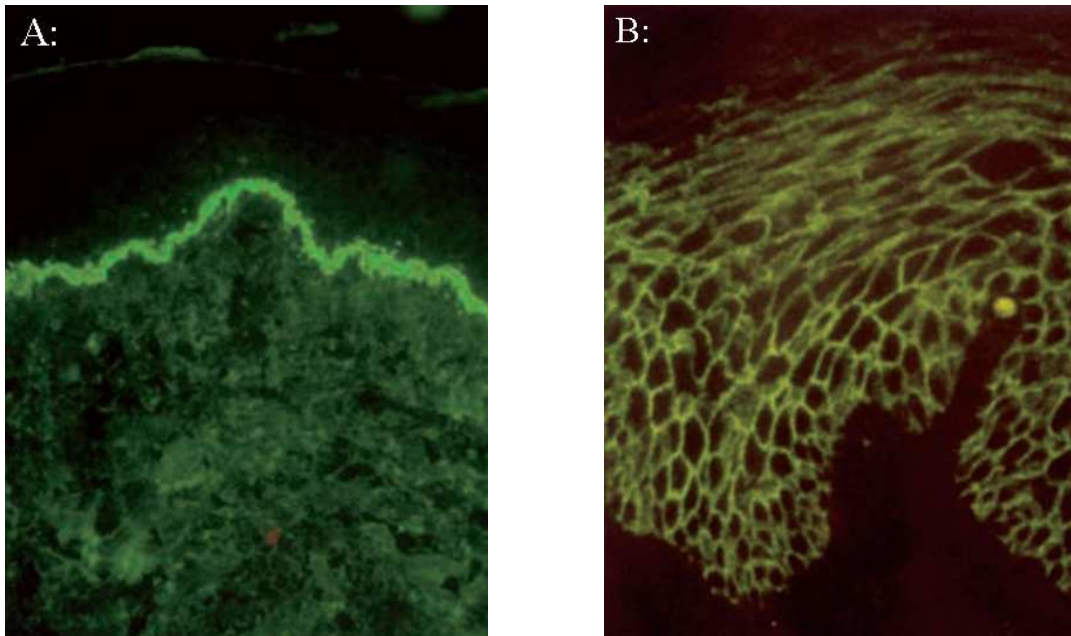


Abb. 1.7: Direkte Immunfluoreszenz (Hertl *et al.*, 2002c, Abb.3):
A: Lineare IgG-Ablagerungen entlang der BMZ beim bullösen Pemphigoid
B: Interzelluläre IgG-Reaktivität in der Epidermis beim Pemphigus

1.8.3 Immunserologische Untersuchungen

Zu den immunserologischen Untersuchungen gehören Immunoblot (Ghohestani, R. *et al.*, 1996) und ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay) (Zillikens *et al.*, 1997; Thoma-Uszynski *et al.*, 2006; Di Zenzo *et al.*, 2008). Beide Untersuchungen können auf der Verwendung rekombinanter Proteine basieren. Dabei handelt es sich um synthetisch hergestellte komplette Antigene bzw. bestimmte Antigen-Sequenzen, mittels derer Antikörper aus Patientenseren nachgewiesen werden können.

Das Prinzip des ELISA stellt sich vereinfacht folgendermaßen dar (Abbildung 1.8): Im ersten Arbeitsschritt wird das Antigen, gegen welches man zirkulierende Antikörper nachweisen bzw. ausschließen möchte, auf einer Trägerplatte immobilisiert. Unspezifische Antikörperbindungsstellen werden geblockt. Durch das Hinzufügen des zu untersuchenden Patientenserums kommen in diesem enthaltene „primäre“ Antikörper

mit den auf der Platte fixierten Antigenen in Kontakt und bilden mit diesen Antigen-Antikörper-Komplexe. In mehreren Waschvorgängen werden die ungebundenen Antikörper entfernt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit enzymmarkierten Zweitantikörpern, die sich gegen die Fc-Region des Erstantikörpers richten. Nach erneutem Waschen wird über das Hinzufügen des enzymespezifischen Substrates das Ausmaß der Immunkomplexbildung als Maß der Antikörperreaktivität photometrisch messbar.

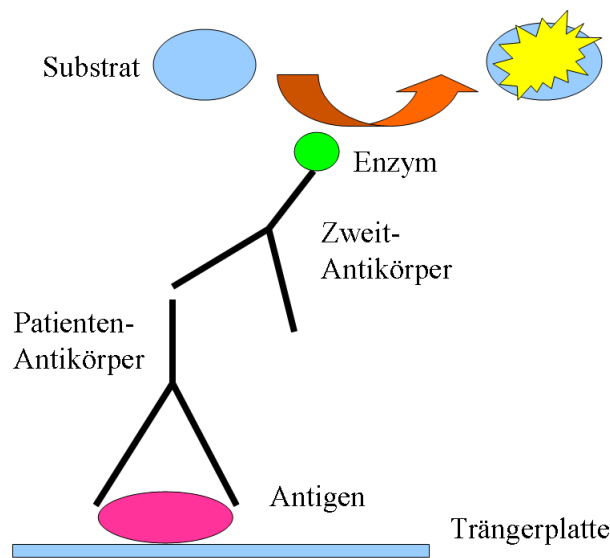


Abb.1.8: Schematische Darstellung des ELISA-Prinzips

Das Prinzip des Immunoblots beruht auf der Trennung von Proteinmolekülen durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Dabei wandern die Moleküle entlang eines elektrischen Feldes und fraktionieren sich in Abhängigkeit von Größe und Ladung, die sich in der Wanderungsgeschwindigkeit niederschlagen. Es schließt sich der Transfer und damit die Immobilisation der Antigene auf einer Nitrozellulose-Membran an, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten bleibt. Dem Blocken unspezifischer Bindungsstellen folgt die Inkubation mit den Serumantikörpern (Primär-Antikörper). Die entstehenden Antigen-Antikörper-Bindungen lassen sich über das Hinzufügen entsprechender enzymmarkierter Sekundär-Antikörper sowie des Substrats detektieren.

1.9 Differentialdiagnosen

Tab. 1.2: Differentialdiagnosen der wichtigsten subepidermalen blasenbildenden Autoimmundermatosen

* SSS: Salt-Split-Skin, 1M NaCl

(modifiziert nach: Hertl *et al.*, 2002c, Tab.1)

Erkrankung	Klinik	Auto-Ag	Histologie	DIF	IIF
Bullöses Pemphigoid	Plaques/ pralle Blasen/ Erosionen auf normaler oder erythematöser Haut	BP180 BP230	Subepidermale Blase mit eosinophilen und neutrophilen Granulozyten	Lineares IgG (selten IgA) und C3 entlang der BMZ	Epidermales IgG, selten kombiniertes epidermales und dermales Muster*
Pemphigoid gestationis	Stammbetonte polyzyklische Plaques und Blasen, stark juckend, 2./3. Trimenon	BP180 selten BP230	Subepidermale Blase mit eosinophilen und neutrophilen Granulozyten	Lineares IgG und C3 entlang der BMZ	Epidermales IgG*
Vernarbendes Schleimhautpemphigoid	Erosiver/ ulzerativer Schleimhautbefall, Tendenz zur Vernarbung, Hautbefall möglich	BP180 BP230 Laminin 5 / 6 $\alpha 6\beta 4$ -Integrin	Subepidermale Blase, Fibrosierung und narbige Schrumpfung	Lineares IgG (selten IgA) und C3 entlang der BMZ	Epidermales IgG oder IgA, selten dermales Muster bei pos. Laminin 5-Ak*
Epidermolysis bullosa acquisita	Mechanobullöse und inflammatorische Form, Mundschleimhautbefall, später Milien- und Narbenbildung	Kollagen VII	Subepidermale Blase mit Neutrophilen, später Milien- und Narbenbildung	Lineares IgG (oder IgA bei IgA-Variante) und C3 entlang der BMZ	Dermales IgG (oder IgA)*
Lineare IgA-Dermatose	Äußerst heterogen, beim Kind z.T. perlschnurartige Anordnung praller Blasen mit zentrifugaler Ausbreitung, häufig Schleimhautbefall	BP180 BP230 LABD97 LAD-1 Kollagen VII	Subepidermale Blase mit Neutrophilen	Lineares IgA und C3 entlang der BMZ	Epidermales IgA, selten dermales oder kombiniertes Muster*
Dermatitis herpetiformis Duhring	Urtikarielle ödematöse Papeln /Plaques, pralle Blasen z.T. herpetiform konfiguriert, starker Juckreiz, Exkorationen, Assoziation mit Zöliakie	Endomysium glatter Muskelzellen, Gewebstransglutaminase	Subepidermale Blase, Mikroabszesse mit massenhaft Eosinophilen und Neutrophilen	Granulärer IgA- (und C3-) Ablagerungen in den Papillenspitzen und der BMZ	IgA gegen Endomysium

1.9.1 Pemphigoid-Gruppe

Neben dem bereits ausführlich beschriebenen bullösen Pemphigoid gehören weitere Erkrankungen in die Pemphigoid- Gruppe (Tabelle 1.2).

1.9.1.1 Pemphigoid gestationis (Herpes gestationis)

Hierbei handelt es sich um eine im 2. oder 3. Trimenon auftretende Schwangerschaftsdermatose, die mit stark juckenden stammbetonten polyzyklischen Plaques und Blasen unterschiedlicher Größe einhergeht. Die gegen BP180 (selten BP230) gerichteten IgG können transplazentar auf das ungeborene Kind übertragen werden und dort zu einer Blasenbildung führen, die nach einigen Wochen spontan abheilt (Giudice *et al.*, 1993; Hertl *et al.*, 2002a). Die Wahrscheinlichkeit, eine Plazentainsuffizienz zu erleiden, ist erhöht (Mascaro *et al.*, 1995). Die diagnostischen Resultate entsprechen denen des BP, wobei das Auftreten während der Gravidität die Diagnose sichert.

1.9.1.2 Vernarbendes Schleimhautpemphigoid

Hierbei handelt es sich um eine seltene Variante, die durch ein heterogenes Erscheinungsbild gekennzeichnet ist. Im Vordergrund steht ein oraler und konjunktivaler Schleimhautbefall, der im chronischen Verlauf eine Tendenz zur Vernarbung zeigt. Auch die übrigen Schleimhäute und die Haut (vor allem Kopf und oberer Stamm) können betroffen sein (Mutasim *et al.*, 1993; Chan *et al.*, 2002). Die zirkulierenden und gewebsgebundenen Antikörper gehören hauptsächlich der IgG-Klasse an, seltener wird kombiniert oder ausschließlich IgA gefunden. Sie zielen neben den BP-typischen Antigenen BP180 (vor allem C-terminal) und BP230 (Bernard *et al.*, 1990b; Balding *et al.*, 1996) in unterschiedlicher Häufigkeit auf Laminin 5 und 6 (Domloge-Hultsch *et al.*, 1992; Chan *et al.*, 1997), $\alpha\beta 4$ -Integrin (Tyagi *et al.*, 1996; Bhol *et al.*, 2000; Bhol *et al.*, 2001) und weitere noch nicht genauer beschriebene Proteine ab.

Lichtmikroskopisch und mittels Immunfluoreszenz zeigt sich analog zum BP eine subepidermale Blasenbildung, IgG/IgA- und Komplementablagerungen entlang der BMZ, sowie ein epidermales Fluoreszenzmuster der IIF humaner Spalthaut. Erst im späteren vernarbenden Stadium imponiert die Fibrosierung und narbige Schrumpfung. Eine Ausnahme bilden Patienten mit einer Antikörperreaktion gegen Laminin 5, die in der IIF, analog der Lage des Laminin 5, auch an der *dermalen* Seite des Spaltes Immunglobulinkomplexe zeigen (Shimizu *et al.*, 1995).

1.9.1.3 Sehr seltene Varianten

Zu den sehr seltenen Varianten gehört u.a. der Lichen planus pemphigoides, der ebenfalls mit Antikörpern gegen BP180 einhergeht. Vermutet wird eine Assoziation des Lichen ruber planus mit einem oft erst Jahre später auftretenden BP (Yancey *et al.*, 2000).

1.9.2 Epidermolysis bullosa acquisita

Mit einer Inzidenz von 0,5/1.000.000 tritt die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) deutlich seltener auf als das BP, betrifft dann allerdings jüngere Patienten. Die Erscheinungsformen sind äußerst vielfältig und reichen von einer klassischen nicht-inflammatorischen mechanobullösen Form bis hin zu einer selteneren inflammatorischen Form, die das BP maskiert (Briggaman *et al.*, 1985; Zillikens *et al.*, 1994). Bei Ersterer wird aufgrund erhöhter Hautfragilität durch minimale Traumata eine pralle Blasenbildung meist im Bereich der Arme und Beine induziert, deren Abheilung im Gegensatz zur inflammatorischen Form regelmäßig mit einer Milien- und Narbenbildung einhergeht. Neben dem häufigen Mundschleimhautbefall können auch die Konjunktiven, der Ösophagus, Vagina und Anus involviert sein. Die Übergänge der einzelnen Erscheinungsformen sind fließend und das klinische Bild kann im Krankheitsverlauf variieren (Wieme *et al.*, 1999). Immunpathologisch finden sich zirkulierende Antikörper der Klasse IgG oder IgA, die gegen Kollagen VII gerichtet sind, welches der Hauptbestandteil der dermalen Ankerfibrillen ist (Woodley *et al.*, 1984). Dies äußert sich anhand eines dermalen Fluoreszenzmusters innerhalb der Spalthaut (Woodley 1990). Der pathologische Prozess findet somit relativ tief in der BMZ statt, woraus die Tendenz zur Narben- und Milienbildung deutlich wird.

1.9.3 Lineare IgA-Dermatose

Die lineare IgA-Dermatose (LAD; chronisch bullöse Dermatitis des Kindesalters) stellt die häufigste blasenbildende Autoimmundermatose des Kindesalters dar, kann aber auch Erwachsene betreffen. Sowohl immunpathologisch als auch klinisch finden sich

zahlreiche Variationen. Bei Kindern manifestiert sich die LAD klinisch häufig in Form einer perlschnurartigen Anordnung praller Blasen, die urtikariell, anulär oder polyzyklisch konfigurierte Plaques umgeben und zu einer zentrifugalen Ausbreitung neigen (Hertl *et al.*, 2002a). Prädilektionsstellen bilden die periorale Gesichtshaut, Schleimhäute sowie der Genitalbereich. Aber auch vollkommen uncharakteristische Effloreszenzen kommen vor, die eine rein klinische Differenzierung vom kindlichen BP oder der EBA des Kindesalters häufig unmöglich machen. Sind erwachsene Patienten erkrankt, so präsentieren sich verschiedenste Erscheinungsbilder, die von minimalen Plaques bis hin zu einer disseminierten Blasenbildung reichen können (Hertl *et al.*, 2002a). Die Diagnosestellung gelingt somit mittels histologischer und serologischer Tests. In der DIF finden sich typischerweise lineare IgA- (mitunter auch IgG-) Ablagerungen entlang der BMZ (Wojnarowska *et al.*, 1988). Bedingt durch die verschiedenen Autoantigene der LAD liefert die IIF humaner Spalthaut teils ein epidermales, seltener auch ein dermales oder kombiniertes Fluoreszenzmuster (Willsteed *et al.*, 1990). Auf der epidermalen Seite sind hierfür BP180 und BP230 (Ghohestani, R. F. *et al.*, 1997), sowie ein 97kD (LABD97) (Zone *et al.*, 1990) und ein 120kD (LAD-1) (Marinkovich *et al.*, 1996) schweres Protein verantwortlich, wobei es sich bei letzteren um Spaltprodukte der BP180-Ektodomäne handelt (Marinkovich *et al.*, 1996; Pas *et al.*, 1997; Hirako *et al.*, 1998; Schacke *et al.*, 1998; Zone *et al.*, 1998). Eine enzymatische Spaltung durch Metalloproteasen führt dabei vermutlich zu der Entstehung von Neoepitopen, die eine Autoimmunantwort bedingen (Franzke *et al.*, 2004). Auf der dermalen Seite hingegen kann das EBA-typische Kollagen-VII als antigene Struktur fungieren (Hashimoto *et al.*, 1996). Des Weiteren wird das Vorhandensein zusätzlicher Antigene diskutiert (Wojnarowska *et al.*, 1991). Die Heterogenität des klinischen Bildes und dessen mitunter beobachtete Verwandtschaft zur EBA und/oder zum BP werden anhand der Autoantigene deutlich.

1.9.4 Dermatitis herpetiformis Duhring

Die Dermatitis herpetiformis Duhring (DH) ist eine sich häufig im frühen Erwachsenenalter manifestierende, seltene, chronisch rezidivierend verlaufende Dermatose, die stets in Assoziation mit einer meist subklinischen Zöliakie (glutensensitive Enteropathie) auftritt (Reunala 1998; Hertl *et al.*, 2002a). Sie ist

gekennzeichnet durch das Nebeneinander uncharakteristischer Erytheme, urtikarieller ödematöser Papeln und Plaques sowie meist kleiner, im Verlauf aber auch größerer praller Blasen, die gelegentlich herpetiform gruppiert sind und mit starkem, schmerzhaft brennendem Juckreiz einhergehen. Kratzspuren und Impetiginisierung sind daher keine Seltenheit. Prädilektionsstellen bilden die Streckseiten der Extremitäten, die Sakralregion und der Schultergürtel, wobei häufig ein symmetrischer Befall vorliegt. Die Involvierung der Mundschleimhaut ist selten. Immunpathologisch finden sich sowohl bei der Zöliakie als auch bei der DH zirkulierende Autoantikörper der Klasse IgA, die gegen das Endomysium glatter Muskelzellen gerichtet sind, wobei die Gewebstransglutaminase als eines der Autoantigene beider Erkrankungen identifiziert werden konnte (Chorzelski *et al.*, 1983; Dieterich *et al.*, 1997; Dieterich *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 1999; Georgi *et al.*, 2001). In der DIF äußert sich dies anhand granulärer IgA- (und C3-) Ablagerungen in den Papillenspitzen der Dermis und in der BMZ periläsionaler Haut. Histologisch finden sich hier Mikroabszesse, die massenhaft eosinophile und neutrophile Granulozyten enthalten und so zur Blasenbildung unterhalb der Lamina densa führen. Interessanterweise ist eine Assoziation der DH zu weiteren Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ1, Autoimmunthyreoiditis, Sjögren-Syndrom und Sarkoidose auffällig (Reunala *et al.*, 1997).

Differentialdiagnostisch muss bei dem Vorhandensein einer subepidermalen Blasenbildung außerdem an eine infektiöse oder medikamentöse Genese gedacht werden.

1.10 Therapie und Prognose

Initial werden in der Regel systemische Glukokortikosteroide in einer Dosierung von 0,5 bis 1 mg/kg Körpergewicht gegeben, wobei die Dosis über Wochen bis Monate logarithmisch reduziert wird (Morel *et al.*, 1984; Joly *et al.*, 2002). Überlappend wird mit einer Basismedikation bestehend aus systemischen Immunsuppressiva bzw. Immunmodulatoren wie bspw. Azathioprin, Mycophenolatmofetil, Ciclosporin A oder Dapsone begonnen (Venning *et al.*, 1989; Guillaume *et al.*, 1993; Wojnarowska *et al.*, 2002; Patton *et al.*, 2006). Auch eine alleinige topische, zweimal täglich angewandte

Therapie mit Glukokortikosteroiden der Wirkstoffklasse IV (z.B. Clobetasolpropionat) wurde beschrieben (Joly *et al.*, 2002). Letztendlich erfolgt die Auswahl der Medikamente anhand der Begleiterkrankungen sowie der Neben- und Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln. Entscheidend ist die Verhinderung weiterer Komplikationen. So sind als Nebenwirkungen der Langzeittherapie mit systemischen Glukokortikosteroiden Osteoporose, Hyperlipidämie, diabetogene Stoffwechsellage, erhöhte Neigung zu opportunistischen Infekten, Ulkulentstehung, Glaukom, Katarakt und Hypertonie bekannt (Roujeau *et al.*, 1998; Joly *et al.*, 2002). Eine Begleitmedikation der systemischen Steroidtherapie, die meist eine Nystatin-Mundpflege zur Prävention oraler Pilzinfektionen sowie Calcium, Vitamin D-Analoga und einen Protonenpumpenhemmer beinhaltet, ist daher empfehlenswert.

Eine Aussage über die Prognose des BP zu stellen gestaltet sich schwierig, da interessanterweise die Daten zur Mortalität innerhalb des ersten Jahres nach Diagnosestellung zwischen 19 bis 41% in europäischen und zwischen 6 bis 12% in US-Studien variieren (Ahmed *et al.*, 1977; Venning *et al.*, 1992; Fivenson *et al.*, 1994; Roujeau *et al.*, 1998; Joly *et al.*, 2002; Rzany *et al.*, 2002; Colbert *et al.*, 2004; Garcia-Doval *et al.*, 2005). Dabei erwiesen sich innerhalb verschiedener europäischer Studien u.a. ein hohes Alter bei Erstdiagnose, ein schlechter Allgemeinzustand (Karnofsky-Index ≤ 40), niedrige Serumalbumin-Level, hochdosierte Glukokortikoide zum Zeitpunkt der Entlassung, ein massiver Hautbefall und das Vorhandensein hoher BP180-Antikörpertiter als prädiktive Faktoren für eine frühe Mortalität (Bernard *et al.*, 1997; Roujeau *et al.*, 1998; Rzany *et al.*, 2002; Joly *et al.*, 2005; Langan *et al.*, 2008).

Als Ursache für die unterschiedlichen Mortalitätsraten europäischer gegenüber amerikanischer Studien wurden in der Vergangenheit u.a. die traditionell verschiedenartigen Behandlungsregime angeführt: Während in Europa die Hospitalisation bei Erstdiagnose den Standard darstellt, ist diese in den USA eher die Ausnahme (Joly *et al.*, 2002; Colbert *et al.*, 2004). Der von Colbert *et al.* daraufhin postulierte Zusammenhang zwischen einer stationären Behandlung und deren Komplikationen (u.a. Sepsis) und der erhöhten Mortalität in Europa konnte allerdings widerlegt werden (Garcia-Doval *et al.*, 2005; Joly *et al.*, 2005). Die medikamentöse Therapie ist in den USA und Europa generell ähnlich und scheidet somit ebenfalls als Erklärungsansatz aus. Insgesamt wird die Situation kontrovers diskutiert und bleibt bisher letztlich ungeklärt.

2 Ziel der Untersuchung

Ziel dieser Arbeit war es, die Assoziation der klinischen Krankheitsaktivität mit der Autoantikörperaktivität von 50 an bullösem Pemphigoid erkrankten Patienten zu untersuchen. Die Datenerhebung erfolgte retrospektiv, wobei ein besonderes Augenmerk auf die Daten, die den Zeitpunkt der Erstdiagnose widerspiegeln, gelegt wurde. Voraussetzung für die Durchführung entsprechender Korrelationsanalysen war die Entwicklung eines Krankheitsaktivitätsscores, anhand dessen die in den Patientenakten dokumentierten Beschreibungen der Effloreszenzen quantifiziert werden konnten. Die IgG-Autoantikörperreaktivitäten wurden im Rahmen der Diagnosestellung mittels eines etablierten ELISA erfasst. Dabei erfolgte eine Differenzierung *dreier* Konstrukte des Zielantigens BP180 sowie *zweier* Konstrukte des Zielantigens BP230, wobei die Ergebnisse in den Patientenakten dokumentiert wurden.

Die folgenden Zielsetzungen bzw. Fragestellungen sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit:

1. Entwicklung eines Krankheitsaktivitätsscores mittels dessen die in den Patientenakten dokumentierten Beschreibungen der Hauteffloreszenzen differenziert erfasst und quantifiziert werden können.
2. Lässt sich eine Assoziation der Krankheitsaktivität, gemessen als Scorehöhe zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, zu einem positiven gegenüber einem negativen IgG-Autoantikörpernachweis im ELISA (*qualitative* Differenzierung) erkennen?

In diesem Rahmen werden die Null- und die Gegenhypothese formuliert als:

- **Nullhypothese:** Es besteht keine Assoziation der Höhe des Scores zu einem positiven gegenüber einem negativen IgG-Autoantikörpernachweis.
- **Gegenhypothese:** Es besteht eine Assoziation der Höhe des Scores zu einem positiven gegenüber einem negativen IgG-Autoantikörpernachweis.

Für welche der fünf Konstrukte lässt sich anhand statistischer Auswertungen die Null-, für welche die Gegenhypothese bestätigen?

3. Wie stellen sich die Antikörperprofile dar? Lässt sich anhand der individuellen Kombination positiv getesteter BP180- und/oder BP230-Konstrukte eine tendenzielle Aussage über die Krankheitsaktivität treffen?
4. Lässt sich bei der *quantitativen* Betrachtung der IgG-Autoantikörperreaktivität im Sinne der Höhe der Antikörperindexwerte eine Assoziation mit der Scorehöhe nachweisen?
5. Wie verhalten sich der Score und die Antikörperindexwerte der fünf Einzelkonstrukte unter Therapieeinfluss im Krankheitsverlauf?
6. Lassen die Ergebnisse im Umkehrschluss auf eine Anwendbarkeit des Scores schließen?

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Die Grundlage der Untersuchungen dieser Arbeit bildete ein Kollektiv von insgesamt 50 an bullösem Pemphigoid erkrankten Patienten, welches im Folgenden als Gesamtkollektiv bezeichnet wird. Dieses Kollektiv setzte sich zusammen aus:

- 20 Patienten, die im Zeitraum August 2004 bis März 2007 in der Hautklinik Marburg behandelt wurden (Klinik für Dermatologie und Allergologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg; im Folgenden als Subkollektiv bezeichnet) und
- 30 Patienten, die sich im Zeitraum August 2001 bis Juli 2004 in der Hautklinik Erlangen (Hautklinik des Universitätsklinikums Erlangen) vorstellten.

Alle Patienten wurden im Rahmen der jeweiligen Autoimmundermatosen-Sprechstunde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hertl betreut. Da Herr Prof. Dr. Hertl bis Juli 2004 als leitender Oberarzt in der Hautklinik Erlangen tätig war und anschließend die Leitung der Hautklinik Marburg übernahm, lag eine konsistente Dokumentation vor. Die Ermittlung der Patientennamen erfolgte anhand eines kontinuierlich geführten Laborbuches, mittels dessen somit auch die Namen der Patienten aus Erlangen eruiert werden konnten.

Die Auswertung der Patientenakten erfolgte retrospektiv. In diese Arbeit eingeschlossen wurden alle Patienten, bei denen sowohl klinisch in Form der typischen Blasenbildung, als auch serologisch mittels IgG-Antikörpernachweis im ELISA (siehe 3.3) zweifelsfrei die Diagnose eines BP gestellt worden war. Lag eine unzureichende Dokumentation der klinischen Daten vor, oder war zur Diagnosestellung kein ELISA herangezogen worden, so wurden diese Patienten von der Erhebung ausgeschlossen. An Sonderformen des BP - wie beispielsweise an vernarbendem Schleimhautpemphigoid - erkrankte Patienten wurden nicht berücksichtigt. Im Vordergrund dieser Arbeit standen die klinischen und serologischen Daten, die den Zeitpunkt der Erstdiagnose widerspiegeln und somit keinem Therapieeinfluss unterlagen. Weiterhin wurden exemplarisch die Daten einer Gruppe von sechs Patienten unter systemischer Glukokortikoidtherapie im Krankheitsverlauf untersucht (siehe 4.4).

3.2 Ermittlung der Krankheitsaktivität anhand eines Scores

Der inhaltliche Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Betrachtung des Verhaltens von Krankheitsaktivität und Antikörperreaktivität zueinander. Dabei stellte die objektive und reproduzierbare Quantifizierung der in den Patientenakten dokumentierten Beschreibungen der Hauteffloreszenzen als Maß der Krankheitsaktivität die Grundlage dar. Ohne sie wären statistische Auswertungen nicht möglich gewesen. In der Literatur finden sich verschiedene Punktesysteme zur Erfassung der Krankheitsausprägung bei blasenbildenden Hauterkrankungen. Da die Ermittlung der Krankheitsaktivität in der vorliegenden Arbeit den Ansprüchen einer retrospektiven Datenerhebung genügen musste, gleichzeitig aber doch so differenziert wie retrospektiv möglich und gleichzeitig sinnvoll erfolgen sollte, machte dies die Entwicklung eines eigenen Scores notwendig.

3.2.1 Berechnung des Scores

Das Prinzip der Score-Berechnung ist in Tabelle 3.1 zusammenfassend dargestellt und ergibt sich wie folgt:

Die Gesamtkörperoberfläche wurde in 10 Areale eingeteilt. Dabei handelte es sich um:

- Kopfhaut,
- Gesicht/Nacken,
- Brust,
- Abdomen,
- Rücken,
- Schleimhäute,
- 2 Arme und
- 2 Beine.

Grundsätzlich konnte für jedes Körperareal minimal 0 und maximal 1 Punkt vergeben werden. Somit ergab sich eine Bandbreite des Scores von 0 bis 10 Punkten. Da der Gesamtpunktwert nicht nur anhand der Anzahl befallener Areale ermittelt werden sollte, sondern zur umfassenderen Evaluation des Krankheitszustandes vielmehr

- die Dichte und somit die **Quantität** der Läsionen eines Areals sowie
- die **Qualität** der entsprechenden Effloreszenzen auf diesem Areal

berücksichtigt werden sollten, setzte sich die Berechnung des Punktwertes pro Areal aus 2 Teilpunkten zusammen, die addiert wurden. Addierte man die Punktwerte der 10 einzelnen Areale, so erlangte man den Gesamtscore.

3.2.1.1 Bestimmung des Punktwertes für die Areale Kopfhaut, Gesicht/ Nacken, Brust, Abdomen, Rücken und Schleimhäute

1. Quantität der Läsionen:

Lagen die beschriebenen Effloreszenzen multipel vor, so wurden dafür 0,5 Punkte vergeben. Wurden sie lediglich als vereinzelt beschrieben, erlangten sie 0,25 Punkte.

2. Qualität der Effloreszenzen entsprechend des Krankheitsstadiums:

Handelte es sich bei den beschriebenen Effloreszenzen um pralle Blasen bzw. Erosionen, wie sie im aktiven Krankheitsstadium auftreten, so wurden dafür 0,5 Punkte erteilt. Stellten sich die Hauterscheinungen allerdings schon als Krusten dar, wie sie für ein in Abheilung befindliches Stadium typisch sind, so wurden dafür 0,25 Punkte berechnet.

Über die Addition der Teilpunkte aus 1. und 2. errechnete sich der Punktwert der einzelnen Areale: Kopfhaut, Gesicht/ Nacken, Brust, Abdomen, Rücken und Schleimhäute. Da sich bei der Aktenauswertung ein Schleimhautbefall ausschließlich für die orale Mukosa fand, sind die folgenden Tabellen auf diese beschränkt. Die übrigen Schleimhäute waren stets erscheinungsfrei.

3.2.1.2 Bestimmung des Punktwertes für die Extremitäten-Areale

Zur Punktwertberechnung der Extremitäten schien eine weitere Differenzierung in Ober- und Unterarm bzw. Ober- und Unterschenkel sinnvoll. Da dennoch pro Areal (je Arm bzw. Bein) nur insgesamt maximal 1 Punkt vergeben werden sollte, wurden die oben genannten Teilpunkte entsprechend halbiert und auf die Subareale (Ober- und Unterarm, Ober- und Unterschenkel) angewandt. Damit ergab sich für die Subareale folgende Berechnung:

1. Quantität der Läsionen:

Wurden die vorliegenden Hauterscheinungen als multipel beschrieben, so erlangten sie 0,25 Punkte. Lagen sie vereinzelt vor, so wurden hierfür 0,125 Punkte berechnet.

2. Qualität der Effloreszenzen entsprechend des Krankheitsstadiums:

Handelte es sich um pralle Blasen bzw. Erosionen, so wurden 0,25 Punkte vergeben. Befanden sich die Effloreszenzen schon in Abheilung und stellten sich somit krustig dar, so wurden 0,125 Punkte erteilt.

Über die Addition der Teilpunkte aus 1. und 2. errechnete sich der Punktwert pro Subareal. Fasste man die zusammengehörigen Subareale zusammen, ergaben sich pro Extremitäten-Areal wiederum ein minimaler Punktwert von 0 sowie ein maximaler Punktwert von 1.

Die Addition der Punktwerte aller 10 einzelnen Areale ergab den Gesamtscore.

3.2.1.3 Zusammenfassende Darstellung der Berechnung des Scores

Tab.3.1: Zusammenfassende Darstellung der Berechnung des Scores
 OA: Oberarm; UA: Unterarm; OS: Oberschenkel; US: Unterschenkel;
 max: maximal; Pw: Punktwert; Angabe in Punkten

	Quantität der Effloreszenzen		Qualität der Effloreszenzen		
	multipel	vereinzelt	erosiv/ blasig	krustig	
(Sub-) Areal					max.Pw./ (Sub-) Areal
Kopfhaut	0,5	0,25	0,5	0,25	1
Gesicht/ Nacken	0,5	0,25	0,5	0,25	1
Brust	0,5	0,25	0,5	0,25	1
Abdomen	0,5	0,25	0,5	0,25	1
Rücken	0,5	0,25	0,5	0,25	1
Orale Mukosa	0,5	0,25	0,5	0,25	1
OA rechts	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
UA rechts	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
OA links	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
UA links	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
OS rechts	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
US rechts	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
OS links	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
US links	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
max. SCORE					10

3.2.2 Zuordnung/ Interpretation abweichender Begrifflichkeiten

Da sich in den Patientenakten wiederholt Begrifflichkeiten fanden, die nicht primär denen der Scoreermittlung entsprachen, sondern in abweichender Ausdrucksweise die Lokalisation, Qualität oder Quantität der Effloreszenzen beschrieben, erfolgte für alle Umschreibungen eine sinnvolle und einheitliche Interpretation, deren Festlegung sich in Tabelle 3.2 findet. Lagen innerhalb eines Areals Effloreszenzen verschiedener Qualität oder Quantität nebeneinander vor, so wurde grundsätzlich der schwerwiegendere Befund gewertet. Dies trug insgesamt wesentlich zur Objektivierung und zur Reproduzierbarkeit der Auswertungen bei.

Tab.3.2: Interpretationsfestlegung abweichender Beschreibungen der Lokalisation, Quantität und Qualität der Effloreszenzen

OA: Oberarm; UA: Unterarm; OS: Oberschenkel; US: Unterschenkel; bds.: beidseits

Wörtliche Beschreibung	Interpretation
Zuordnung der Lokalisation	
gesamtes Integument	alle Areale außer der Schleimhäute
Stamm	Brust + Abdomen + Rücken
Kopf	Kopfhaut + Gesicht/ Nacken
Oberkörper	Brust + Rücken
Mammae, Décollete´	Brust
Arme	OA und UA bds.
Axilla	OA
Ellbeuge	UA
Hand	UA
Beine	OS und US bds.
Leiste	OS
Kniebeuge	US
Fuß	US
Schulter	Rücken
gluteal, perianal	Rücken
Ohren, Lippen	Gesicht
Interpretation der Quantitätsbeschreibungen der Effloreszenzen	
gruppiert	multipel
ausgedehnt	multipel
disseminiert	multipel
teils vereinzelte, teils multiple Effloreszenzen	multipel
nicht beschrieben	multipel
Am gesamten Integument unter Betonung eines bestimmten Areals finden sich multiple Effloreszenzen.	Befall des betonten Areals mit multiplen, des restlichen Integuments mit vereinzelten Effloreszenzen.
Interpretation der Qualitätsbeschreibungen der Effloreszenz	
erosive Plaques	aktives Stadium, Erosion
verkrustete Plaques	abheilendes Stadium, Kruste
teils krustig, teils blasig/erosiv	aktives Stadium, Blasen/Erosionen
Maculae, Erytheme, Hyper-/Hypopigmentierungen	zu unspezifische, daher keine Berücksichtigung

3.2.3 Exemplarische Scoreberechnung für die Patienten 1 bis 3

Zur Veranschaulichung dieses Systems sind im Folgenden die Scoreberechnungen der Patienten 1 bis 3 exemplarisch unter Wiedergabe der Aktendokumentationen dargestellt.

3.2.3.1 Scoreberechnung für Patient 1

Dokumentation des klinischen Hautzustandes in der Patientenakte:

„Ausgedehnte Erosionen und pralle Blasen auf Gesicht, Rücken, Kopfhaut, Schultern, Oberarmen und Mammae.“

Tab.3.3: Berechnung des Scores für Patient 1:
zutreffende Teilpunkte sind gelb markiert;
OA: Oberarm; US: Unterarm; OS: Oberschenkel; US: Unterschenkel; Pw.: Punktwert

	Quantität der Effloreszenzen		Qualität der Effloreszenzen		Pw./ (Sub-) Areal
	multipel	vereinzelt	erosiv/ blasig	krustig	
(Sub-) Areal					
Kopfhaut	0,5	0,25	0,5	0,25	1
Gesicht/ Nacken	0,5	0,25	0,5	0,25	1
Brust	0,5	0,25	0,5	0,25	1
Abdomen	0,5	0,25	0,5	0,25	
Rücken	0,5	0,25	0,5	0,25	1
Orale Mukosa	0,5	0,25	0,5	0,25	
OA rechts	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
UA rechts	0,25	0,125	0,25	0,125	
OA links	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
UA links	0,25	0,125	0,25	0,125	
OS rechts	0,25	0,125	0,25	0,125	
US rechts	0,25	0,125	0,25	0,125	
OS links	0,25	0,125	0,25	0,125	
US links	0,25	0,125	0,25	0,125	
SCORE					5

3.2.3.2 Scoreberechnung für Patient 2

Dokumentation des klinischen Hautzustandes in der Patientenakte:

„Multiple pralle Blasen, teils gelblich eingetrübt, mit deutlich erythematösem Randsaum bis ca. 5 cm Durchmesser und oberflächliche Erosionen am gesamten Integument.“

Tab.3.4: Berechnung des Scores für Patient 2:
zutreffende Teilpunkte sind gelb markiert;
OA: Oberarm; US: Unterarm; OS: Oberschenkel; US: Unterschenkel; Pw.: Punktwert

	Quantität der Effloreszenzen		Qualität der Effloreszenzen		
	multipel	vereinzelt	erosiv/ blasig	krustig	
(Sub-) Areal					Pw./ (Sub-) Areal
Kopfhaut	0,5	0,25	0,5	0,25	1
Gesicht/ Nacken	0,5	0,25	0,5	0,25	1
Brust	0,5	0,25	0,5	0,25	1
Abdomen	0,5	0,25	0,5	0,25	1
Rücken	0,5	0,25	0,5	0,25	1
Orale Mukosa	0,5	0,25	0,5	0,25	
OA rechts	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
UA rechts	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
OA links	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
UA links	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
OS rechts	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
US rechts	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
OS links	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
US links	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
SCORE					9

3.2.3.3 Scoreberechnung für Patient 3

Dokumentation des klinischen Hautzustandes in der Patientenakte:

„An der Mundschleimhaut buccal beidseits multiple Erosionen, Gingiva dunkelrot und geschwollen. Am rechten Oberarm und am linken Handgelenk ca. 0,3 cm große, multiple pralle Blasen auf erythematösem Grund.“

Tab.3.5: Berechnung des Scores für Patient 3:
zutreffende Teilpunkte sind gelb markiert;
OA: Oberarm; US: Unterarm; OS: Oberschenkel; US: Unterschenkel, Pw.: Punktwert

	Quantität der Effloreszenzen		Qualität der Effloreszenzen		
	multipel	vereinzelt	erosiv/ blasig	krustig	
(Sub-) Areal					Pw./ (Sub-) Areal
Kopfhaut	0,5	0,25	0,5	0,25	
Gesicht/ Nacken	0,5	0,25	0,5	0,25	
Brust	0,5	0,25	0,5	0,25	
Abdomen	0,5	0,25	0,5	0,25	
Rücken	0,5	0,25	0,5	0,25	
Orale Mukosa	0,5	0,25	0,5	0,25	1
OA rechts	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
UA rechts	0,25	0,125	0,25	0,125	
OA links	0,25	0,125	0,25	0,125	
UA links	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5
OS rechts	0,25	0,125	0,25	0,125	
US rechts	0,25	0,125	0,25	0,125	
OS links	0,25	0,125	0,25	0,125	
US links	0,25	0,125	0,25	0,125	
SCORE					2

3.3 Ermittlung der ELISA-Daten

Die Erfassung der IgG-Antikörperreaktivität erfolgte mittels ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay) unter Differenzierung verschiedener Konstrukte der beiden Zielantigene BP180 und BP230 (Abbildung 3.1). Bei diesen Konstrukten handelte es sich um:

- BP180-ex,
- BP180-N1,
- BP180-C1,
- BP230-N und
- BP230-C1.

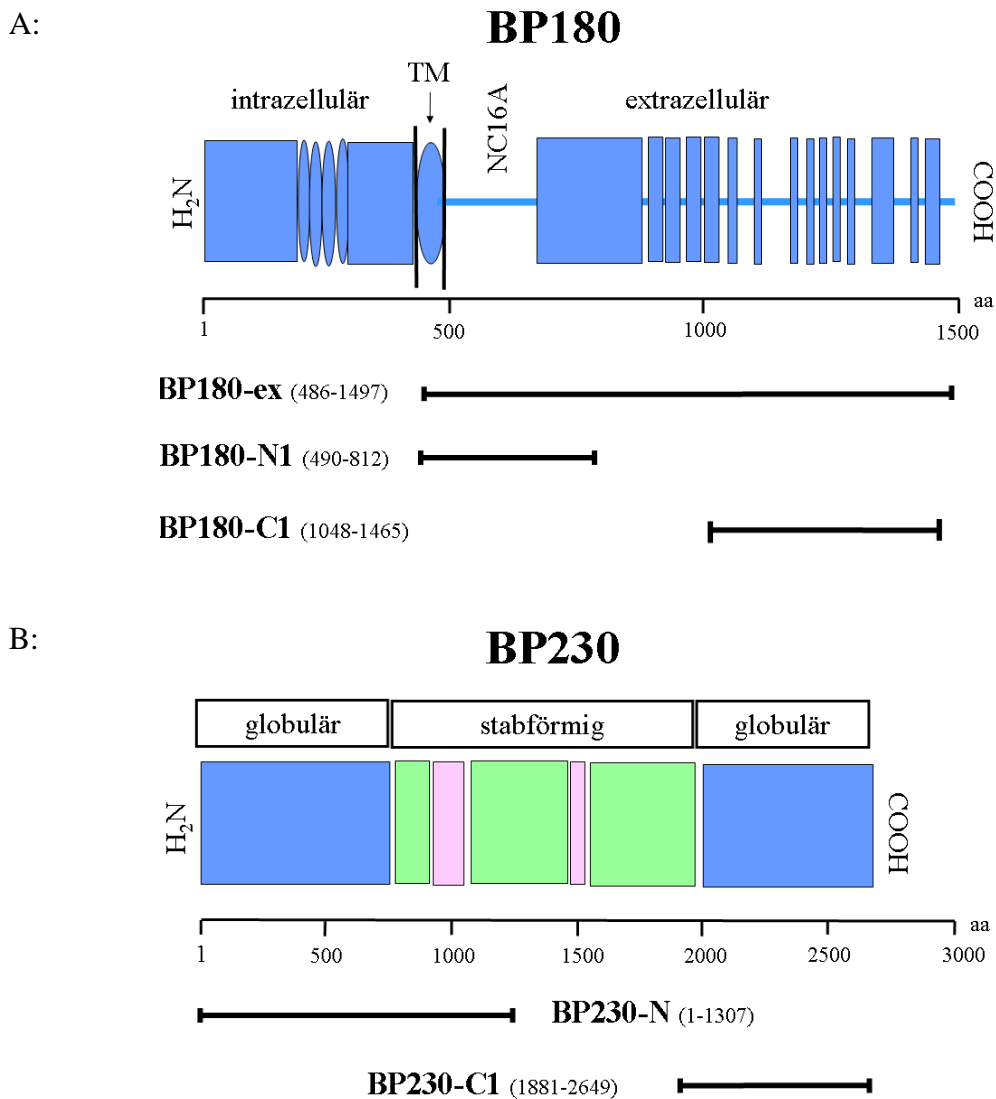


Abb.3.1: Untersuchte Konstrukte des BP180 und des BP230:
Schematische Darstellung der Lage der fünf in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte innerhalb des jeweiligen Gesamtproteins BP180 (A) bzw. BP230 (B); in Klammern Angabe der Aminosäuresequenzen der Einzelkonstrukte

Wie bereits erwähnt, setzte sich das dieser Arbeit zugrunde liegende Patientenkollektiv aus 30 Patienten, die in der Hautklinik Erlangen therapiert wurden, sowie 20 Patienten, die sich in der Hautklinik Marburg vorstellten, zusammen (Abbildung 3.2).

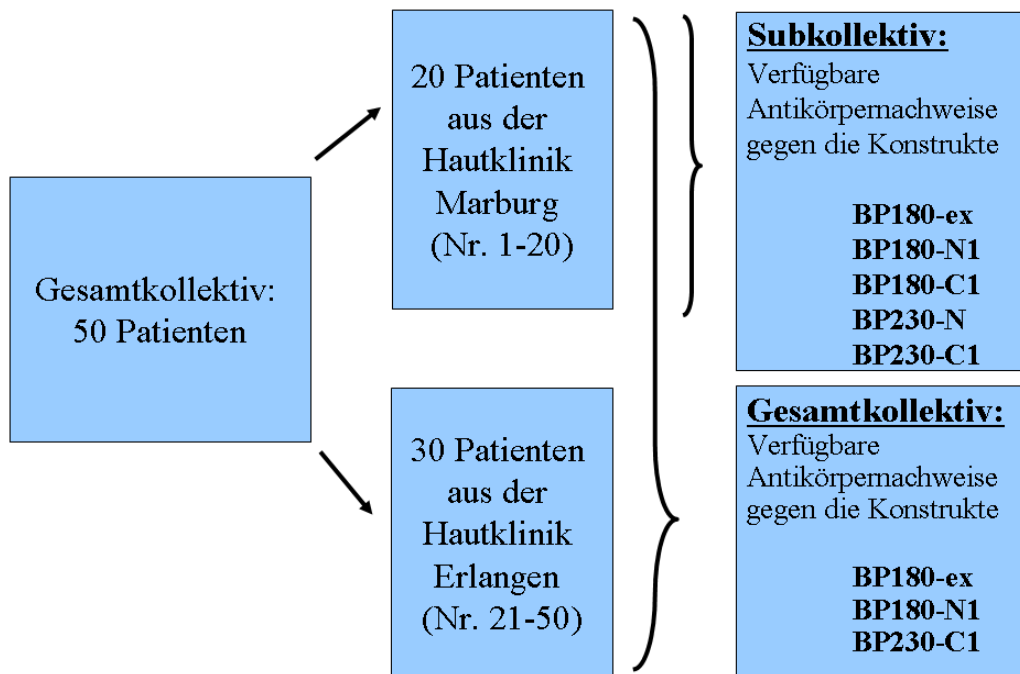


Abb. 3.2: Verfügbarkeit der Antikörpernachweise gegen die einzelnen Konstrukte innerhalb des Gesamt- und des Subkollektivs

Die Seren der Patienten aus Erlangen wurden im Rahmen der ELISA-Diagnostik bei Erstdiagnose durchgehend auf Antikörperreaktivitäten gegen die Konstrukte BP180-ex, BP180-N1 und BP230-C1 getestet (Abbildung 3.1 und 3.2). Die Ergebnisse wurden in den Patientenakten dokumentiert, wodurch sie der Auswertung zugänglich waren. Die Dokumentation beschränkte sich hier allerdings auf die qualitative Unterscheidung eines positiven vs. eines negativen Testergebnisses ohne Angabe der Antikörperindexwerte, welche die Höhe der Antikörperreaktivität widerspiegeln (siehe 3.2.2).

Für die in Marburg vorstelligen Patienten umfasste die Routinediagnostik alle fünf genannten Konstrukte (Abbildung 3.1 und 3.2). Hier erfolgte die Dokumentation der Antikörperindexwerte. Das heißt, dass für das Subkollektiv neben der qualitativen Differenzierung eines positiven gegenüber eines negativen Testergebnisses auch auf quantitativer Ebene eine Aussage über die Intensität der Antikörperreaktivität - quantifiziert als Antikörperindexwert - getroffen werden konnte. Bei einigen der Patienten, bei denen die Dokumentation der Antikörpernachweise initial unvollständig

gewesen war, konnten die ELISA mittels konservierter Seren (-20°C) nachgetestet und diese Patienten somit in die vorliegende Arbeit integriert werden.

Die Durchführung der ELISA war, abgesehen von der Anzahl der untersuchten Konstrukte, für alle Patientenserum gleich.

3.3.1 Expression und Aufreinigung von BP180- und BP230- rekombinanten Proteinen

Bei den Antigenen, die zur Beschichtung der Trägerplatten verwendet wurden, handelte es sich um die rekombinanten Fusions-Proteine BP180-ex, BP180-N1, BP180-C1, BP230-N und BP230-C1 (Abbildung 3.1), die zwecks Nachweis und Aufreinigung (s.u.) N-terminal über einen GST- (Glutathion-S-Transferase-) und 6xHis-Tag verfügten.

Für ihre Herstellung kam ein sog. Baculovirus-Expressionssystem (BEVS: Baculovirus Expression Vector System; Pharmingen) zum Einsatz (Thoma-Uszynski *et al.*, 2006). Das BEVS ist ein eukaryotisches Doppelstrang-DNA-System, das durch die Infektion einer Wirtszelle mit rekombinantem Baculovirus die Expression entsprechender rekombinanter Proteine in dieser Zelle erzielt. Grundlegend dafür muss das Genom des Baculovirus so verändert werden, dass es die DNA der zu exprimierenden Proteine beinhaltet.

Bei dem hier verwendeten Baculovirus handelte es sich um den ausschließlich insektenpathogenen und –spezifischen *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis* Virus (AcNPV), der Insekten der Spezies Lepidoptera befällt. Zur Herstellung der hier verwendeten rekombinanten Proteine kamen Insektenzellen der Lepidoptera-Art *Spodoptera frugiperda* (SF, hier SF21-Zelllinie) zum Einsatz.

Die für die Entstehung des rekombinanten Baculovirus benötigte cDNA der zu exprimierenden oben genannten Konstrukte des humanen BP180 und BP230 wurde nach beschriebenem Protokoll generiert und amplifiziert (Borradori *et al.*, 1997; Skaria *et al.*, 2000). Da das Baculovirusgenom selbst zu lang ist, um als Klonierungsvektor verwendet zu werden, machte man sich den Einsatz eines Transfervektors zunutze. Nach der Subklonierung der amplifizierten cDNA-Fragmente in einen Baculovirus-Transfervektor (pAcGHLT-A; BD, Pharmingen, San Diego, California) erfolgte die Ko-Transfektion zusammen mit der Baculovirus-DNA (SixPack, BD, Clontech, Palo Alto,

California) in die SF21-Insektenzellen. Eine Homologie der Endsequenzen des Transfervektors zum Baculovirusgenom ermöglichte die Rekombination von Transfervektor und Baculovirusgenom in der Wirtszelle. Das Ergebnis war ein rekombinanter Baculovirus, bei dem nicht-überlebensnotwendige Gensequenzen durch heterologe Gene ersetzt worden waren. In den mit diesem rekombinanten Virus infizierten SF21-Zellen wurde nun die Virusamplifikation (im Verhältnis (Virus : SF21-Zellen) < 1 ; MOI (multiplicity of infection) < 1) vollzogen (Amagai *et al.*, 1994), der die Proteinproduktion in SF21-Zellen (MOI=10) nach beschriebenem Schema folgte (Haase *et al.*, 1998). Neben den genannten rekombinanten Proteinen wurde auch ein GST/6xHis-Kontrollprotein generiert, indem bei der Ko-Transfektion ein leerer Transfervektor verwendet wurde.

Drei Tage nach Beginn der Proteinproduktion schloss sich die Aufreinigung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen an mit dem Ziel, die intrazellulär in den Insektenzellen akkumulierten Proteine zu isolieren (Thoma-Uszynski *et al.*, 2004; Thoma-Uszynski *et al.*, 2006). Nach der Abzentrifugation der infizierten Zellen vom Nährmedium wurden diese im ersten Schritt lysiert, indem ca. 10×10^6 baculovirus-infizierte Zellen in 1 ml 6 M Guanidin-Hydrochlorid suspendiert und bei -20°C über 24 Stunden inkubiert wurden. Nach anschließender Zentrifugation ($2000 \times g$, 15 min) erhielt man im Überstand des Lysats das gelöste Protein, das mittels Affinitätschromatographie über Nickel-NTA Agarosegel (Qiagen, Hilden, Deutschland) weiter aufgereinigt wurde. Dabei machte man sich die 6xHis-Markierung der Proteine zunutze, über die die Bindung der Proteine an die Nickelmatrix erfolgte. Die Elution der Gelgebundenen Proteine gelang mittels Elutionspuffer, der Imidazol enthielt und zwecks Verhinderung der Ausfällung des Proteins mit 8 M Harnstoff versetzt war. Das Imidazol verdrängte dabei über seine im Vergleich zu Histidin stärkere Affinität zu Nickel die His-gekoppelten rekombinanten Proteine aus ihrer Matrixbindung. Die daraufhin abzentrifugierbaren proteinhaltigen Eluate wurden graduell gegen Phosphat-gepufferte Salzlösung bei 4°C über 48 Stunden dialysiert, um verbliebene Imidazolreste aus dem Dialysat zu entfernen. Die Lagerung der gereinigten Proteine erfolgte bei -80°C . Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte anhand eines modifizierten Protokolls nach Lowry mit Hilfe eines kommerziellen Tests (DC Protein Assay; Bio Rad, München, Deutschland).

Ein Nachweis der rekombinanten Proteine wurde durch Gelelektrophorese und Western Blot erbracht. Bei der Gelelektrophorese wandern Moleküle auf einem Träger-Gel entlang eines elektrischen Feldes und fraktionieren sich in Abhängigkeit von Größe und Ladung, die sich in der Wanderungsgeschwindigkeit niederschlagen. Hier kam die Natrium-Dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) zum Einsatz, als deren Trägersubstanz das feinporige Polyacrylamidgel fungierte. Durch die Maskierung der Protein-Eigenladung mit dem negativ geladenen Detergens SDS (sodium dodecyl sulfate) trennten sich die Moleküle ausschließlich aufgrund ihres Molekulargewichtes. Die daraus resultierenden Banden wurden zum einen direkt mittels Coomassie-Färbung visualisiert. Zum anderen erfolgte im Western Blot die Immobilisation der fraktionierten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Auf dieser Membran konnte die Immunreaktivität der Proteine mittels gegen GST gerichtete Antikörper (Maus, 1:2000, clone GST3-4C; Zymed, San Francisco, California), die an die GST- Markierung der rekombinanten Proteine banden, unter Zusatz von gegen diese gerichtete enzymgekoppelte Zweitantikörper und der entsprechenden Substratlösung nachgewiesen werden. Das Mitlaufen eines Größenmarkers bei der Gelelektrophorese ermöglichte das Ablesen des Molekulargewichtes der Proteine und anhand dessen deren Zuordnung und Nachweis.

3.3.2 ELISA-Analysen unter Verwendung BP180- und BP230- rekombinanter Proteine

Die auf oben genannte Weise im Baculovirus-Expressionssystem gewonnenen rekombinanten Proteine kamen nun im ELISA nach beschriebenem Schema zur Anwendung (Thoma-Uszynski *et al.*, 2004; Thoma-Uszynski *et al.*, 2006).

Verwendete Materialien:

- **Mikrotitrierplatten** (96-well polystyrene plates, Maxisorb Immunoplate, Nunc, Wiesbaden, Deutschland)
- Rekombinantes aufgereinigtes **Protein**
- **0,1 M Bikarbonatpuffer** (NaHCO₃, pH=9,8)
- **Waschpuffer TTBS** (TBS (0,2 M Tris + 1,5 M NaCl; pH:7,5) mit 0,05% Tween 20; Merck, Nürnberg, Deutschland)

- **Blockpuffer** (5% Milchpulver (Magermilchpulver, Merck, Darmstadt, Deutschland) in Waschpuffer TTBS (TBS (0,2M Tris + 1,5M NaCl; pH:7,5) mit 0,05% Tween 20; Merck, Nürnberg, Deutschland))
- **Patientenseren**
- **Alkalische Phosphatase-markierte, gegen humanes IgG gerichtete Ziegen-Antikörper** (alkaline phosphatase-labeled goat anti-human-IgG; 1/6000, Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland, USA)
- **p-Nitrophenylphosphat-Substratlösung** (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland, USA)
- **Photometer** (microplate reader, Tecan Magellan, Salzburg, Österreich)

Durchführung:

Beim ersten Schritt, dem sog. „coating“, wurden die Antigene auf der Mikrotiterplatte immobilisiert. Dazu wurden in jede Kavität der Mikrotiterplatte 0,5 µg des rekombinanten Proteins BP180-ex, -N1, -C1, BP230-N und -C1 oder eine äquimolare Menge des GST/6xHis-Kontrollproteins in 100 µl 0,1 M Bikarbonatpuffer pipettiert und bei 4 °C für 5 Stunden inkubiert. Dem fünfmaligen Waschen mit TTBS-Waschpuffer folgte das Blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit je 100 µl Blockpuffer bei Raumtemperatur über 2 Stunden. Dem Abgießen des Blockpuffers schloss sich das Hinzufügen von 50 µl der 1:50 in Blockpuffer verdünnten Patienten- und Kontrollseren an, wodurch die im Serum enthaltenen Antikörper in Kontakt mit den auf der Platte fixierten Antigenen kamen. Nach zwölfstündiger Inkubation bei 4 °C wurden die Platten erneut fünfmal gewaschen, um nicht-gebundene Bestandteile zu entfernen. Zur Erfassung der entstandenen Antigen-Antikörper-Reaktionen erfolgte eine Beschichtung jeder Kavität mit Alkalische Phosphatase-markierten Sekundärantikörpern, die sich gegen menschliches IgG richteten. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und erneutem fünfmaligen Waschen mit Waschpuffer schloss sich eine Beschichtung der Mikrotiterplatten mit 100 µl p-Nitrophenylphosphat-Substratlösung an, wodurch die Enzymreaktion in Gang gesetzt wurde. Die Intensität der Enzymreaktion als Maß der Antigen-Antikörper-Reaktionen wurde anhand der Extinktion im Photometer bei 405 nm bestimmt, sobald ein definiertes Patientenserum (Positivkontrolle) eine optische Dichte (OD) von 1,0 erreicht hatte.

Es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung der Seren. Die Standardisierung aller Extinktionsdaten fand anhand der positiven und negativen internen Standards statt, die festgelegt wurden auf 1 und 0 OD Einheiten. Zur Einschätzung der Variabilität der einzelnen Platten befanden sich auf jeder Platte identische interne Kontrollen in Form von zwei positiven und einem negativen Kontrollserum. Anhand der Mittelwerte (MW) der OD-Doppelbestimmungen der Positiv- und Negativkontrollen sowie des Patientenserums konnte für letzteres mittels folgender Formel je ein antigenzugehöriger Antikörperindexwert (PIV: Pemphigoid Index Value) errechnet werden, wodurch eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Platten und Patienten gewährleistet wurde:

$$\text{PIV} = \frac{\text{MW (Patientenserum)} - \text{MW (Negativkontrolle)}}{\text{MW (Positivkontrolle)} - \text{MW (Negativkontrolle)}} \times 100$$

Der PIV der Positivkontrolle liegt damit grundsätzlich bei 100, der der Negativkontrolle bei 0. Die Schwellenwerte der als positiv zu wertenden Testergebnisse sind wie folgt definiert:

- BP180-ex: PIV \geq 20
- BP180-N1: PIV \geq 28
- BP180-C1: PIV \geq 28
- BP230-N: PIV \geq 17
- BP230-C1: PIV \geq 10

Die Sensitivität und die Spezifität stellen sich für die Einzelkonstrukte folgendermaßen dar (Di Zenzo *et al.*, 2008):

	Sensitivität	Spezifität
• BP180-ex	71%	94%
• BP180-N1	78%	97%
• BP180-C1	78%	69%
• BP230-N	61%	84%
• BP230-C1	59%	92%

3.4 Statistische Auswertung

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Säulendiagramme, Punktwolken und Boxplots wurden unter Anwendung des biometrischen Programms SPSS (Vers.12.0) generiert. Die Säulendiagramme demonstrieren zum einen die absoluten Häufigkeiten der positiven und negativen IgG-Antikörpernachweise im ELISA, aus denen sich die relativen Häufigkeiten berechnen ließen. Zum anderen veranschaulichen sie die Geschlechts- und Altersverteilungen. Für letztere erfolgte (ebenfalls in SPSS) die Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichungen. Die Punktwolken veranschaulichen die Scoreverteilung innerhalb der Kollektive. Der Darstellung einer Assoziation von ELISA-Daten und Score zueinander dienen die Boxplots. Dabei zeigen die „Boxen“ die erste und dritte Quartile der Verteilungswolken sowie den Median in Form einer Linie. Die Ausläufer der Boxen (sog. „Whiskers“) repräsentieren die Werte unterhalb der ersten und oberhalb der dritten Quartile innerhalb der 1,5-fachen Interquartilenspanne. Außerhalb dessen gelegene Ausreißer stellen sich als Kreise dar. Auch die Abbildungen, die im Ergebnisteil 4.4 der Untersuchung einer Gruppe von 6 Patienten im Krankheitsverlauf unter Therapie gewidmet sind, wurden mittels SPSS unter Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen generiert.

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie (Herr PD Dr. H. Müller, Marburg). Da den Daten keine Normalverteilung zu Grunde lag, kamen nicht-parametrische Tests zur Anwendung. Diese wurden mit Hilfe der biometrischen Software StatXact (Vers.6, Cytel Software Corporation, Cambridge, USA) für die beiden Variablen „ELISA-Daten“ und „Score“ durchgeführt. Es galt die Assoziation dieser beiden Variablen zueinander bezüglich der unterschiedlichen BP180- und BP230-Konstrukte in Hinblick auf die formulierte Null- und Gegenhypothese zu untersuchen. Dabei wurden die p-Werte anhand des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests berechnet. Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Für die Bestimmung der Konfidenzintervalle (KI) sowie der Punktwerte (jeweils für 95%iges Vertrauen) kam die Hodges-Lehmann-Schätzung zur Anwendung.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Scoreberechnung sowie ELISA- und epidemiologische Daten

Die Ermittlung des Scores als Maß der klinischen Krankheitsschwere erfolgte systematisch wie unter 3.2 beschrieben für alle 50 Patienten und ist in Tabelle 4.1 zusammenfassend dargestellt. Die drei darauf folgenden Tabellen 4.2, 4.3 und 4.4 stellen die ELISA-Daten subsumierend dar. Im Rahmen der Diagnostik wurden alle Patientenserien auf Antikörperreaktivitäten gegen die Konstrukte BP180-ex, BP180-N1 und BP230-C1 getestet, wobei die Dokumentation in den Krankenakten der 30 Patienten aus Erlangen qualitativ erfolgt war, d.h., dass hier nur zwischen einem positiven und einem negativen Testergebnis differenziert wurde (Tabelle 4.3). Bei der Subgruppe der 20 in Marburg behandelten Patienten wurden zusätzlich die Konstrukte BP180-C1 und BP230-N auf ihrer Antikörperreaktivität hin untersucht. Hier wurden die Antikörperindexwerte (PIV) aller fünf Konstrukte dokumentiert. Somit sind für das Subkollektiv neben qualitativen auch quantitative Aussagen zu den Antikörperreaktivitäten aller Konstrukte möglich (Tabelle 4.2). In Tabelle 4.5 finden sich die epidemiologischen Daten zu Alter und Geschlecht.

Tab.4.1: Berechnung des Scores für das Gesamtkollektiv

Patient	Kopfhaut	Gesicht/ Nacken	Brust	Abdomen	Rücken	OA re.	UA re.	OA li.	UA li.	OS re.	US re.	OS li.	US li.	Orale Mukosa	Summe
1	1	1	1		1	0,5		0,5							5,00
2	1	1	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		9,00
3						0,5			0,5					1	2,00
4						0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		4,00
5	1	1	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		9,00
6			1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		7,00
7			0,75	0,75	0,75	0,375	0,375	0,375	0,375	0,5		0,375	0,375		5,00
8							0,375		0,375						0,75
9			0,75	0,75	0,75	0,375	0,375	0,375	0,375	0,375	0,375	0,375	0,375		5,25
10	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,375	0,5	0,375	0,5	0,375	0,375	0,375	0,375		7,00
11	0,75	0,75	0,75	1	0,75	0,5	0,5	0,5	0,5	0,375	0,5	0,375	0,5		7,75
12		0,5					0,5		0,5		0,5		0,5		2,50
13			0,75	0,75	0,75	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		6,25
14			1		1					0,375	0,5	0,375	0,5		3,75
15	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		7,75
16											0,5				0,50
17			1		1	0,5	0,5	0,5	0,5						4,00
18	0,75		0,75	0,75	0,75	0,375	0,375	0,375	0,375						4,50
19	0,75	1	1	1	1	0,375	0,375	0,375	0,375	0,5	0,5	0,5	0,5		8,25
20		1			1						0,5		0,5		3,00
21			1		1	0,5		0,5		0,5	0,5	0,5	0,5	1	6,00
22			0,75		0,75	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		5,50
23		0,75	1		1	0,5	0,5			0,5	0,5	0,5	0,5		5,75
24	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,375	0,375	0,375	0,375	0,375	0,375	0,375	0,375		6,75
25			0,75		0,75			0,375						0,75	2,63

Tab.4.2: ELISA-Daten der Patienten 1-20 (Marburg):

5 Einzelkonstrukte, qualitativer (0=negativ, 1=positiv) und quantitativer (Pemphigoid-Index Wert, PIV) IgG-Nachweis; Score

Patient	Score	BP180-ex	PIV (BP180-ex)	BP180-N1	PIV (BP180-N1)	BP180-C1	PIV (BP180-C1)	BP230-N	PIV (BP230-N)	BP230-C1	PIV (BP230-C1)
1	5,00	1	53	1	37	1	29	0	6	0	8
2	9,00	1	169	1	197	0	10	0	5	0	3
3	2,00	0	16	0	27	1	40	0	4	0	0
4	4,00	1	84	1	106	1	37	0	10	0	8
5	9,00	1	66	1	80	1	102	1	92	0	6
6	7,00	1	88	1	112	0	2	0	6	1	34
7	5,00	0	19	0	11	1	43	1	75	0	6
8	0,75	0	3	0	9	0	2	0	7	1	59
9	5,25	1	24	0	27	1	34	1	41	1	72
10	7,00	1	118	1	144	1	46	1	124	1	22
11	7,75	1	85	1	77	1	40	1	82	1	156
12	2,50	0	9	0	9	0	13	0	11	1	91
13	6,25	1	97	1	168	1	30	0	15	1	90
14	3,75	1	26	0	17	0	15	0	4	1	76
15	7,75	1	141	1	91	1	117	1	22	1	10
16	0,50	1	29	1	31	0	9	1	24	1	79
17	4,00	1	74	1	87	1	70	0	7	0	7
18	4,50	1	48	1	41	1	93	0	10	0	9
19	8,25	1	113	1	115	1	29	0	5	0	5
20	3,00	0	12	1	29	0	15	0	6	0	9

Tab.4.3: ELISA-Daten der Patienten 21-50 (Erlangen):

3 Einzelkonstrukte, qualitativer IgG-Nachweis (0=negativ, 1=positiv); Score

Patient	Score	BP180-ex	BP180-N1	BP230-C1	Patient	Score	BP180-ex	BP180-N1	BP230-C1
21	6,00	1	1	0	36	2,00	1	1	0
22	5,50	1	1	1	37	6,00	1	1	1
23	5,75	1	0	1	38	9,00	1	1	1
24	6,75	1	0	1	39	7,00	1	0	1
25	2,63	1	1	1	40	4,00	1	1	1
26	1,50	1	0	0	41	9,00	1	1	1
27	5,00	1	1	1	42	3,88	1	0	0
28	5,00	1	1	0	43	1,38	0	0	1
29	5,50	1	1	0	44	9,00	1	1	0
30	7,50	1	0	1	45	8,38	1	1	1
31	5,00	1	0	1	46	3,00	1	0	1
32	2,00	1	0	1	47	0,50	0	1	0
33	2,00	1	0	1	48	0,75	0	0	1
34	5,00	1	1	1	49	7,75	1	1	1
35	8,25	1	1	0	50	3,75	1	1	1

Tab.4.4: Absolute und relative Anzahl der Patienten mit positivem BP180- und/oder BP230- Antikörperrnachweis im Gesamt- (n=50) und Subkollektiv (n=20)

	Subkollektiv		Gesamtkollektiv	
	Anzahl der Patienten		Anzahl der Patienten	
	absolut	relativ (%)	absolut	relativ (%)
nur BP180 positiv	8	40	17	34
nur BP230 positiv	2	10	4	8
BP180 und BP230 positiv	10	50	29	58
insgesamt	20	100	50	100
BP180 positiv	18	90	46	92
BP230 positiv	12	60	33	66

Tab.4.5: Epidemiologische Daten des Gesamtkollektivs zu Alter und Geschlecht
(1 = weiblich; 2 = männlich)

Patient	Alter	Geschlecht	Patient	Alter	Geschlecht
1	85	1	26	80	2
2	51	1	27	85	1
3	69	1	28	74	1
4	78	1	29	74	2
5	85	1	30	82	2
6	85	1	31	74	2
7	85	1	32	67	2
8	81	1	33	72	2
9	74	1	34	97	2
10	99	1	35	73	1
11	79	2	36	83	2
12	73	1	37	87	2
13	86	1	38	73	1
14	68	2	39	71	1
15	96	1	40	76	1
16	80	1	41	71	2
17	83	1	42	79	2
18	58	2	43	86	1
19	76	2	44	82	2
20	71	1	45	93	1
21	49	1	46	87	1
22	85	1	47	81	1
23	82	2	48	78	2
24	77	2	49	86	2
25	79	1	50	72	1

In den folgenden Abschnitten werden das Gesamtkollektiv (siehe 4.2) und das Subkollektiv (siehe 4.3) auf analoge Weise analysiert. Neben der Alters- Geschlechts- und Scoreverteilung werden zum einen auf *qualitativer* Ebene die Häufigkeiten der positiven vs. negativen Antikörpernachweise der Einzelkonstrukte beleuchtet. Zum anderen werden diese Antikörperreaktivitäten mit der Höhe des Scores korreliert. Diesem schließt sich die Analyse der Antikörperprofile im Kollektiv an.

Daraufhin folgt die Betrachtung der Assoziation von Scorehöhe und Antikörperreaktivität unter Berücksichtigung der *quantitativen* Antikörperindexwerte innerhalb des Subkollektivs (siehe 4.3.4). Die Grundlage all dieser Untersuchungen bilden Daten, die den Zeitpunkt der Erstdiagnose widerspiegeln.

Abschließend wird exemplarisch das Verhalten der klinischen und serologischen Daten von sechs Patienten unter Therapieeinfluss im Krankheitsverlauf beleuchtet (siehe 4.4).

4.2 Gesamtkollektiv

4.2.1 Alters-, Geschlechts- und Scoreverteilung des Gesamtkollektivs

Der Altersdurchschnitt des Gesamtkollektivs liegt bei 78 Jahren, wobei die weiblichen Patienten mit 60% gegenüber den männlichen Patienten überwiegen (Abbildung 4.1). Epidemiologisch gesehen kann somit von einem repräsentativen Gesamtkollektiv ausgegangen werden. Des Weiteren zeigt sich, dass die gesamte Bandbreite des Scores in annähernd gleichmäßiger Verteilung im Gesamtkollektiv vertreten ist (Abbildung 4.2).

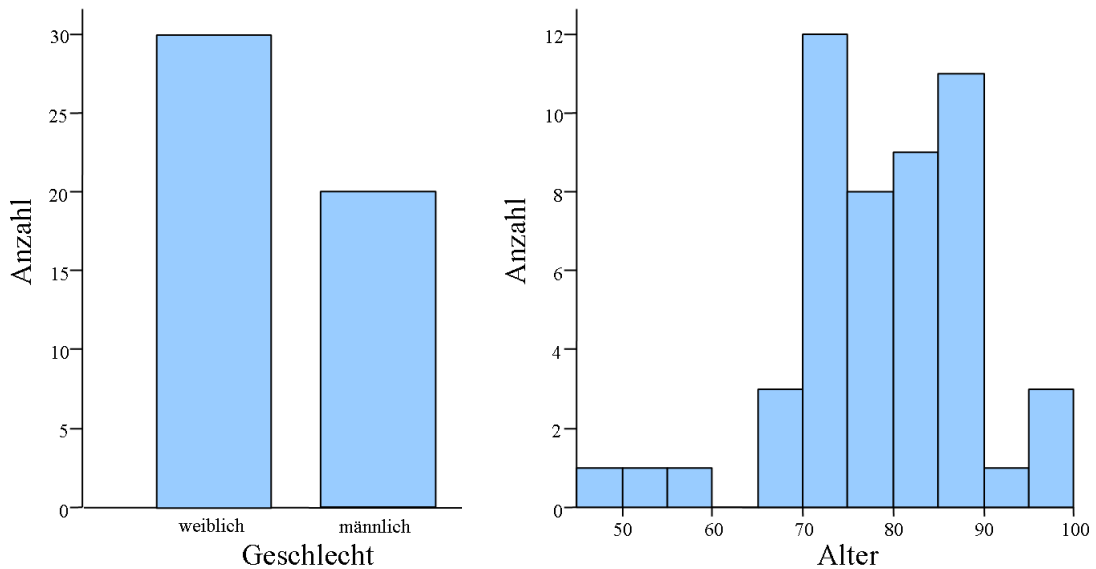


Abb. 4.1: Geschlechtsverteilung (n=50; weiblich: 60%, männlich:40%) und Altersverteilung (n=50; Mittelwert:78,3 Jahre; Standardabweichung:9,9 Jahre) des Gesamtkollektivs

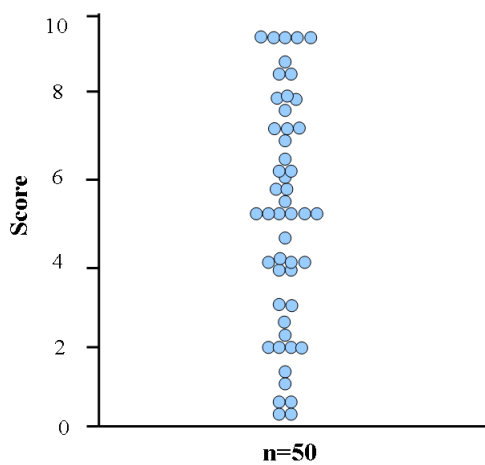


Abb. 4.2: Scoreverteilung im Gesamtkollektiv (n=50)

4.2.2 Ergebnisse der Einzelkonstruktuntersuchungen des Gesamtkollektivs

Insgesamt weisen 92% des Gesamtkollektivs eine positive Autoantikörperreaktivität gegen mindestens eines der BP180-Konstrukte auf, wo hingegen sich nur in 66% der Seren eine BP230-spezifische Antikörperreaktivität detektieren lässt (Tabelle 4.4).

Im Hinblick auf das Konstrukt BP180-ex (Abbildung 4.3) zeigen 84% der Patientenseren ein positives Testergebnis im ELISA. Dabei lässt sich bei der Betrachtung des Boxplots eine deutliche Assoziation einer positiven Reaktivität gegen BP180-ex und hohem Score (Median 5,5) und umgekehrt einer negativen Reaktivität gegen BP180-ex und niedrigem Score (Median 1,7) erkennen. Der mittels Hodges-Lehmann-Schätzung ermittelte Punktwert von 3,7 bedeutet, dass mit 95%igem Vertrauen die Verteilung der positiven BP180-ex-Antikörpernachweise um plus 3,7 Scorepunkte gegenüber der Verteilung der negativen BP180-ex-Antikörpernachweise verschoben liegt. Das Konfidenzintervall (KI) umfasst den Bereich von 2 bis 5,37 und zeigt damit - ebenfalls mit 95%igem Vertrauen - an, dass die positive Antikörperreaktivität assoziiert ist mit einem um mindestens 2 und maximal 5,37 Punkte größeren Score im Vergleich zur negativen Antikörperreaktivität. Da das KI die Null nicht umfasst und zusätzlich der p-Wert kleiner 0,05 ist, wird die Gegenhypothese angenommen: Es besteht eine statistisch signifikante Assoziation der Höhe des Scores zu einem positiven vs. einem negativen BP180-ex-IgG-Autoantikörpernachweis.

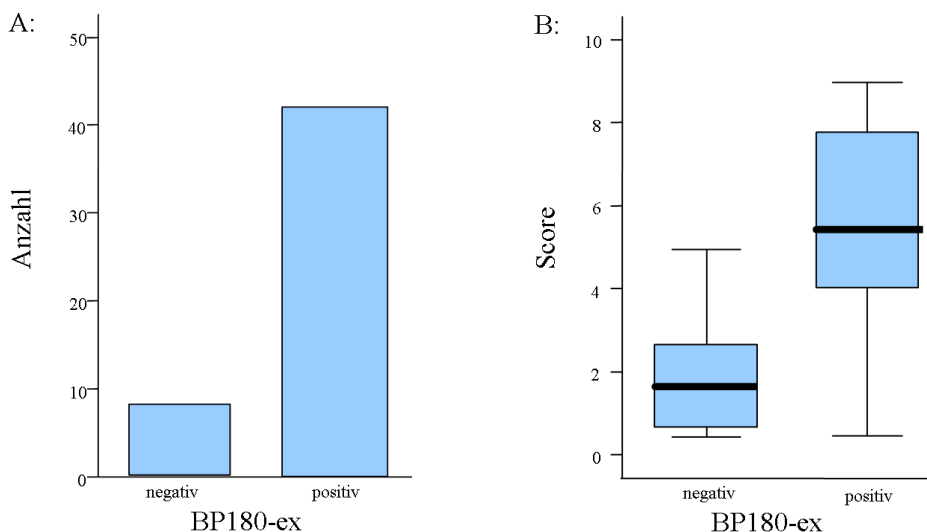


Abb. 4.3: Antikörperreaktivität gegen BP180-ex (n=50 Patienten):
 A: Häufigkeit der positiven (42 Patienten = 84%) und negativen (8 Patienten = 16%) BP180-ex-IgG-Antikörpernachweise
 B: Assoziation der Antikörperreaktivität (positiv vs. negativ) mit der Höhe des Scores: Median (positiv) =5,5; Median (negativ) =1,7; p=0,0001; KI={2; 5,37}; Punktwert: 3,7 Scorepunkte

Bei der Betrachtung des Konstruktes BP180-N1 (Abbildung 4.4) zeigt sich ein ähnliches Bild: Es überwiegen weiterhin die positiv auf BP180-N1 getesteten Patientenseren (64%) gegenüber denen mit negativem Testergebnis (36%). Auch hier findet sich bei der Betrachtung des Boxplots eine Korrelation von positivem BP180-N1-Antikörpernachweis und hohem Score (Median von 5,8) und umgekehrt von fehlender Reaktivität gegen BP180-N1 und niedrigem Score (Median von 3,4). Der Punktwert von 2,3 Scorepunkten zeigt, verglichen mit dem des BP180-ex, eine etwas geringere Verschiebung der beiden Verteilungen gegeneinander an. Dazu passend liegt das KI des BP180-N1 etwas näher an Null (Abbildung 4.6). Es umfasst den Bereich 0,75 bis 3,75 und sagt damit aus, dass mit 95%igem Vertrauen die positive Antikörperreaktivität assoziiert ist mit einem um mindestens 0,75 und maximal 3,75 Punkte größeren Score im Vergleich zur negativen Antikörperreaktivität. Da das KI wiederum die Null nicht umfasst, und zusätzlich der p-Wert kleiner 0,05 ist, erweist sich die beobachtete Assoziation von Antikörperreaktivität und Score auch hier als statistisch signifikant.

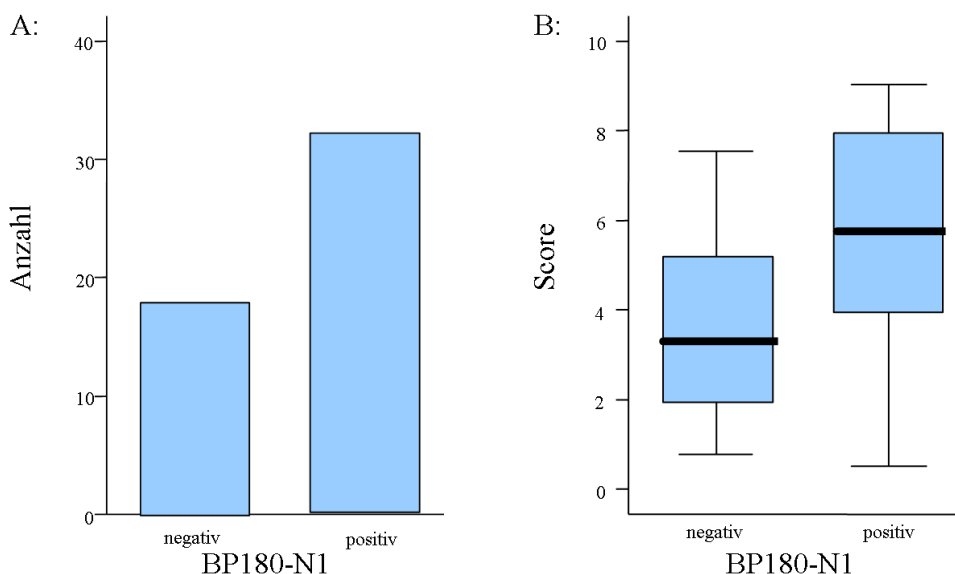


Abb. 4.4: Antikörperreaktivität gegen BP180-N1 (n=50 Patienten):

A: Häufigkeit der positiven (32 Patienten = 64%) und negativen (18 Patienten = 36%) BP180-N1-IgG-Antikörpernachweise

B: Assoziation der Antikörperreaktivität (positiv vs. negativ) mit der Höhe des Scores: Median (positiv) =5,8; Median (negativ) =3,4; p=0,0041; KI={0,75; 3,75}; Punktwert: 2,3 Scorepunkte

Die Ergebnisse des BP230-C1 (Abbildung 4.5) unterscheiden sich hingegen deutlich von denen der beiden oben genannten BP180-Konstrukte: Zwar ähnelt die Häufigkeitsverteilung der auf BP230-C1 positiv (62%) und negativ (38%) getesteten Patientenseren der des Konstruktes BP180-N1. Dabei zeigt sich allerdings bei der Betrachtung des Boxplots in Abbildung 4.5 sowohl für die Gruppe der positiven als auch für die Gruppe der negativen BP230-C1-IgG-Nachweise ein nahezu identischer Median von 5,3 bzw. 5,0. Die Verschiebung der beiden Verteilungen wird entsprechend auf einen Punktwert von 0 Scorepunkten geschätzt, was einen deutlichen Unterschied zu den vorausgegangenen Konstrukten des BP180 anzeigt. Das relativ enge KI umschließt fast gleichmäßig die Null und gibt somit an, dass die Scores keine relevanten Unterschiede bei negativer gegenüber positiver Antikörperreaktivität zeigen (Abbildung 4.6). Aufgrund des hohen p-Werts und des die Null umfassenden KI muss die Nullhypothese angenommen werden. Das heißt, dass keine statistisch signifikante Assoziation der Höhe des Scores zu einem positiven vs. einem negativen BP230-C1-IgG-Autoantikörpernachweis besteht.

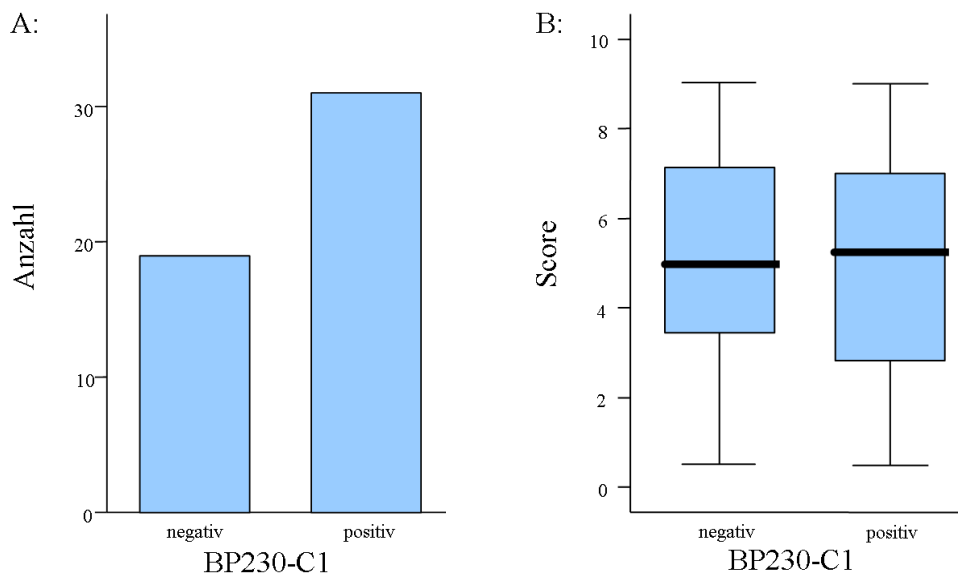


Abb.4.5: Antikörperreaktivität gegen BP230-C1 (n=50 Patienten):

- A: Häufigkeit der positiven (31 Patienten = 62%) und negativen (19 Patienten = 38%) BP230-C1-IgG-Antikörpernachweise
- B: Assoziation der Antikörperreaktivität (positiv vs. negativ) mit der Höhe des Scores: Median (positiv) =5,3; Median (negativ) =5,0; $p=0,9407$; KI={-1,5; +1,87}; Punktwert: 0 Scorepunkte

Die Ergebnisse des BP230-C1 stehen somit in deutlichem Gegensatz zu denen der oben genannten Konstrukte des BP180. Auf der Grundlage der statistischen Auswertungen wird für die Konstrukte BP180-ex und -N1 die Gegenhypothese angenommen, wohingegen für das Konstrukt BP230-C1 die Nullhypothese akzeptiert werden muss (Abbildung 4.6).

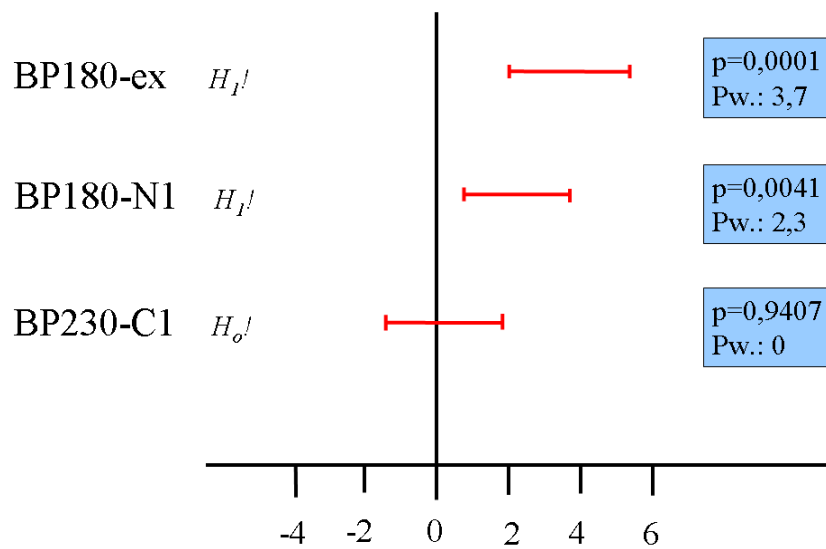


Abb.4.6: Zusammenfassung der statistischen Auswertung des Gesamtkollektivs:
 Rote Linien: Konfidenzintervalle, Angabe in Scorepunkten
 p: p-Wert, statistische Signifikanz für $p < 0,05$
 Pw.: Punktwert, Angabe in Scorepunkten
 $H_1!$: Gegenhypothese wird angenommen; $H_0!$: Nullhypothese wird angenommen

4.2.3 Antikörperprofil des Gesamtkollektivs

Betrachtet man nun das Antikörperprofil der Patienten des Gesamtkollektivs (Tabelle 4.6) so zeigt sich, dass ein kombinierter positiver Antikörpernachweis gegen alle drei der untersuchten Konstrukte bei einem Drittel der Patienten anzutreffen ist. Die zugehörigen Scores zeigen dabei eine Bandbreite von 0,5 bis 9 Punkten auf. Der Mittelwert liegt bei 6 Punkten und ist damit nahezu identisch zu dem, der sich aus der Kombination eines BP180-ex- und BP180-N1-Antikörpernachweises ergibt. Das Vorhandensein einer BP230-C1-Antikörperreaktivität scheint hier also weder für den Mittelwert noch für die Bandbreite des Scores wesentlich ausschlaggebend zu sein. Dies stimmt überein mit den zuvor dargestellten Ergebnissen, die keine Assoziation der Höhe des Scores zu einem positiven gegenüber einem negativen BP230-C1-Antikörpernachweis herstellen konnten.

Bei 16% der untersuchten Patientenseren stellt sich ein Befall von lediglich einem der untersuchten Konstrukte dar. Die Mittelwerte der zugehörigen Scores sind hier grundsätzlich kleiner als bei kombiniertem Befall, wobei sie von BP180-ex über BP180-N1 nach BP230-C1 abnehmen. Die Aussagekraft dieser Mittelwerte ist aber aufgrund der kleinen Fallzahl von 2 bis 4 Patienten eingeschränkt.

Da nur insgesamt 5 Patienten eine Involvierung der Mundschleimhaut präsentierten, lässt sich hier keine Tendenz eines zugehörigen Antikörperprofils erkennen.

Tab.4.6: Antikörperprofil des Gesamtkollektivs (n=50):

In Klammern: Patienten mit Befall der oralen Mukosa; MW: Mittelwert;

*: 2 Patienten reagierten nur auf die im Subkollektiv zusätzlich untersuchten Konstrukte

positiv getestete Konstrukt/ positiv getestete Konstruktkombinationen	Anzahl (Patienten)		Score- bandbreite	MW (Score)
	absolut	relativ (%)		
BP180-ex	2	4	1,5 - 3,9	2,7
BP180-N1	2	4	0,5 - 3,0	1,8
BP230-C1	4	8	0,8 - 2,5	1,4
BP180-ex + BP180-N1	13 (2)	26	2,0 - 9,0	6,1
BP180-ex + BP230-C1	10	20	2,0 - 7,5	4,8
BP180-N1 + BP230-C1	-	0	-	-
BP180-ex + BP180-N1 + BP230-C1	17 (2)	34	0,5 - 9,0	6
keins der Konstrukte*	2 (1)	4	2,0 - 5,0	3,5
Total	50	100		

4.3 Subkollektiv

4.3.1 Alters-, Geschlechts- und Scoreverteilung des Subkollektivs

Die Altersverteilung des Subkollektivs entspricht der des Gesamtkollektivs, wobei sich allerdings das Geschlechterverhältnis innerhalb des Subkollektivs weiter zu Gunsten der Frauen verschiebt, die hier mit 80% deutlich überwiegen (Abbildung 4.7). Betrachtet man die Scoreverteilung des Subkollektivs, so zeigt sich analog zum Gesamtkollektiv, dass die gesamte Bandbreite des Scores in annähernd gleichmäßiger Verteilung vertreten ist (Abbildung 4.8).

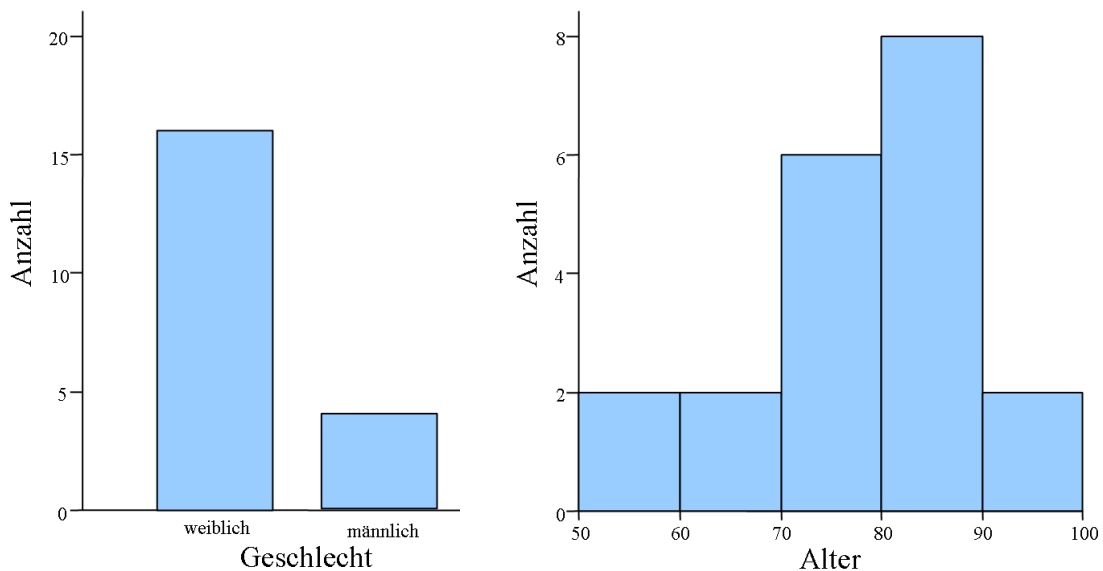


Abb. 4.7: Geschlechtsverteilung (n=20; weiblich: 80%; männlich: 20%) **und Altersverteilung** (n=20; Mittelwert: 78,1 Jahre; Standardabweichung: 11,4 Jahre) **des Subkollektivs**

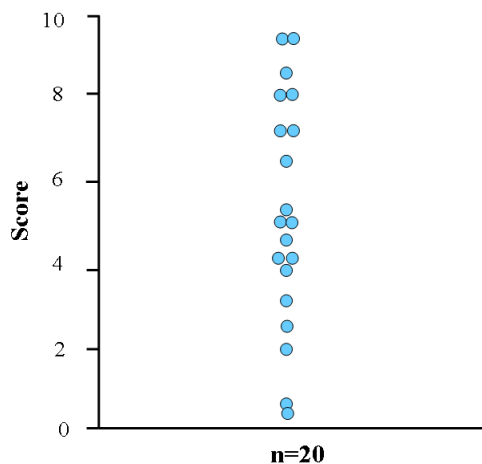


Abb. 4.8: Scoreverteilung im Subkollektiv (n=20)

4.3.2 Ergebnisse der Einzelkonstruktuntersuchungen des Subkollektivs

Betrachtet man das Subkollektiv, so zeigt sich, dass insgesamt 90% der getesteten Seren eine positive IgG-Antikörperreaktivität gegen mindestens eines der BP180-Konstrukte aufweisen, während sich nur in 60% der Fälle eine BP230-spezifische Antikörperreaktivität detektieren lässt (Tabelle 4.4). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den entsprechenden Resultaten des Gesamtkollektivs.

Des Weiteren bestätigt sich sowohl bei der Untersuchung des Konstruktes BP180-ex (Abbildung 4.9) als auch bei der Untersuchung des Konstruktes BP180-N1 (Abbildung 4.10) eine statistisch signifikante, positive Assoziation von Antikörperreaktivität und Score: Dies äußert sich für beide Konstrukte in p-Werten kleiner 0,05 sowie in Konfidenzintervallen, die jeweils die Null nicht umfassen. Folglich kommt es zur Annahme der Gegenhypothese, formuliert als statistisch signifikante Assoziation von Antikörperreaktivität und Scorehöhe, wobei ein positiver IgG-Antikörpernachweis vermehrt mit einem hohen Score einhergeht und umgekehrt. Im Vergleich der beiden Konstrukte zeigt sich - analog zum Gesamtkollektiv - für BP180-N1 wiederum ein etwas näher an Null gelegenes KI sowie ein minimal kleinerer Punktwert als Schätzer der Verschiebung der Verteilungen der positiven und negativen Antikörperreaktivität gegeneinander (Abbildung 4.14). Im Vergleich zu BP180-N1 ist die Datenlage des Konstruktes BP180-ex somit auch im Subkollektiv etwas deutlicher. Signifikanz besteht wiederum für beide genannten Konstrukte.

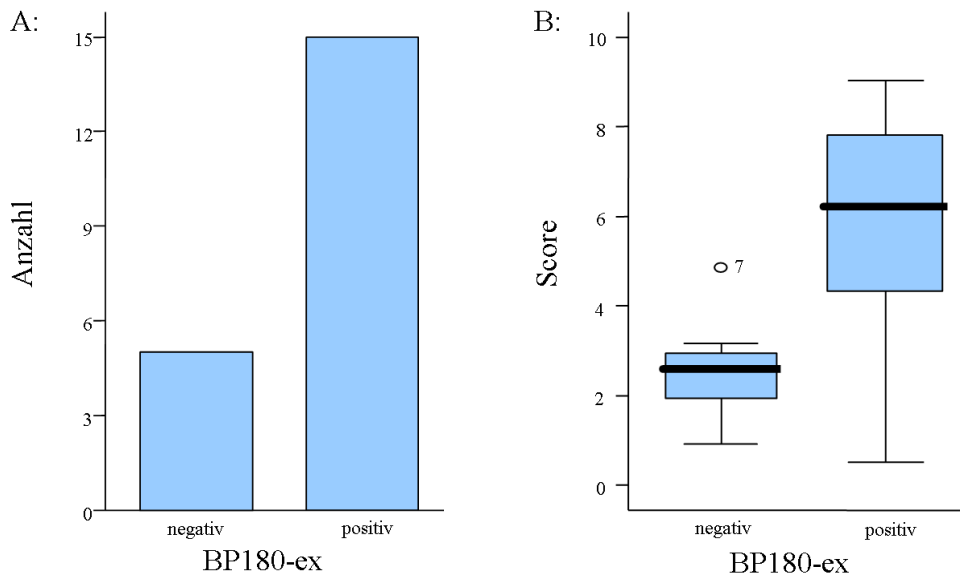


Abb.4.9: Antikörperreaktivität gegen BP180-ex (n=20 Patienten):
 A: Häufigkeit der positiven (15 Patienten = 75%) und negativen (5 Patienten = 25%) BP180-ex-IgG-Antikörpernachweise
 B: Assoziation der Antikörperreaktivität (positiv vs. negativ) mit der Höhe des Scores: Median (positiv) =6,3; Median (negativ) =2,5; p=0,0119; KI={1,25; 5,75}; Punktwert: 3,3 Scorepunkte

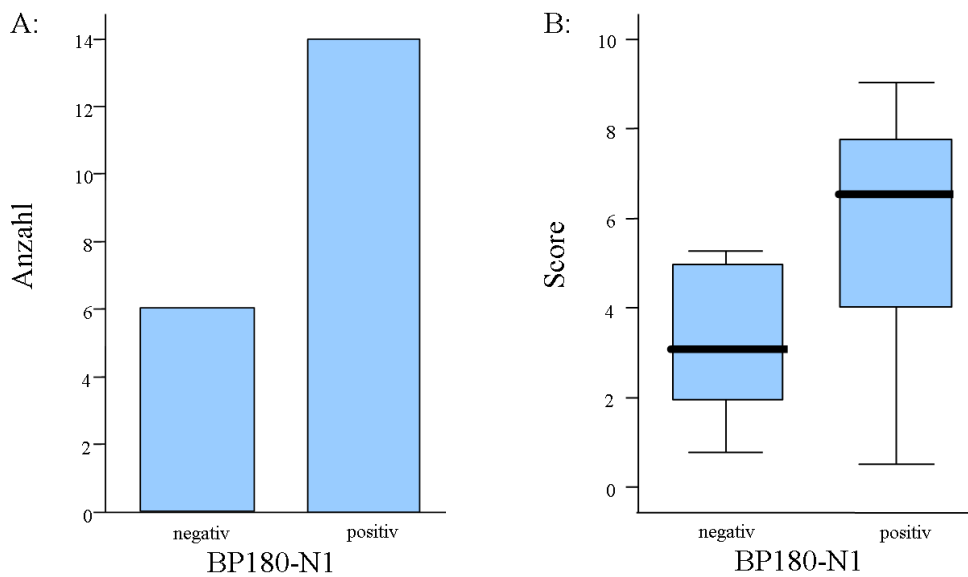


Abb.4.10: Antikörperreaktivität gegen BP180-N1 (n=20 Patienten):
 A: Häufigkeit der positiven (14 Patienten = 70%) und negativen (6 Patienten = 30%) BP180-N1-IgG-Antikörpernachweise
 B: Assoziation der Antikörperreaktivität (positiv vs. negativ) mit der Höhe des Scores: Median (positiv) =6,6 Median (negativ) =3,1; p=0,0336; KI={0,25; 5,25}; Punktwert: 2,9 Scorepunkte

Auch bei der Untersuchung des Konstruktes BP180-C1 überwiegen die positiv getesteten Patientenseren (Abbildung 4.11). Dabei ist tendenziell eine Verknüpfung positiver Antikörperreaktivität mit höheren Scores und umgekehrt erkennbar. Bei der statistischen Auswertung ergibt sich allerdings ein p-Wert größer 0,05 in Kombination mit einem die Null umfassenden KI. Aufgrund dieser Konstellation kann die Nullhypothese - anders als bei den vorausgegangenen BP180-Konstrukten - nicht ausgeschlossen werden. Betrachtet man das KI differenzierter, fällt auf, dass dieses breit ist und von $-0,75$ bis $+4,75$ Scorepunkten reicht (Abbildung 4.14). Das heißt, dass durchaus noch relevante Scoreunterschiede bei einem positiven vs. einem negativen Antikörpernachweis möglich sind. Die Gegenhypothese darf daher hier nicht automatisch ausgeschlossen werden. Abhilfe würde die Erhöhung der Fallzahl schaffen. Würde ein daraus resultierendes schmales KI weiterhin die Null umschließen, könnte sicher die Nullhypothese angenommen werden. Denn je enger und gleichmäßiger das KI die Null umschließt, desto weniger unterscheiden sich die Scores für einen positiven gegenüber einem negativen IgG-Nachweis. Die größere Fallzahl könnte aber auch in einem signifikant kleinen p-Wert und einem außerhalb der Null liegenden, schmalen KI resultieren. Dann wäre die Annahme der Gegenhypothese die richtige Schlussfolgerung. Man kann hier abschließend also nicht sicher annehmen, dass *keine* Assoziation der Krankheitsaktivität mit der BP180-C1-Antikörperreaktivität besteht.

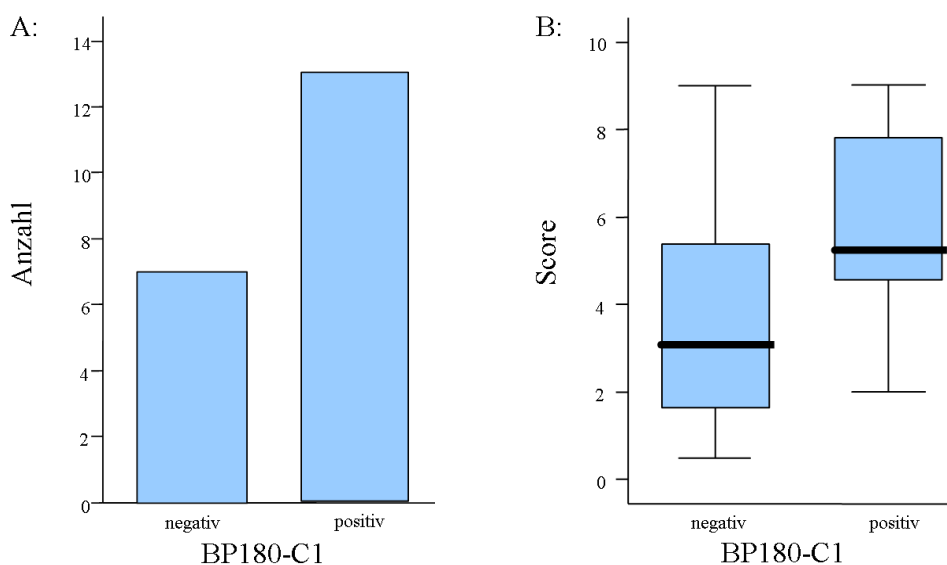


Abb.4.11: Antikörperreaktivität gegen BP180-C1 (n=20 Patienten):

A: Häufigkeit der positiven (13 Patienten = 65%) und negativen (7 Patienten = 35%) BP180-C1-IgG-Antikörpernachweise

B: Assoziation der Antikörperreaktivität (positiv vs. negativ) mit der Höhe des Scores: Median (positiv) = 5,3; Median (negativ) = 3; $p=0,0929$; KI={-0,75; +4,75}; Punktwert: 2,3 Scorepunkte

Betrachtet man nun das Konstrukt BP230-N, so fällt auf, dass die Minderheit der untersuchten Patientenseren (35%) einen positiven Antikörpernachweis gegen dieses Konstrukt aufweist (Abbildung 4.12). Die statistische Analyse einer Assoziation klinischer und serologischer Daten führt aufgrund der Konstellation des p-Werts und des KI zur Annahme der Nullhypothese. Wegen des breiten, asymmetrisch die Null umfassenden KI kann – analog zu dem Konstrukt BP180-C1- allerdings wiederum nicht sicher angenommen werden, dass *keine* Assoziation der Krankheitsaktivität mit der BP230-N-Antikörperreaktivität besteht (Abbildung 4.14). Ein endgültiger Nachweis könnte auch hier nur über die Erhöhung der Fallzahl erbracht werden.

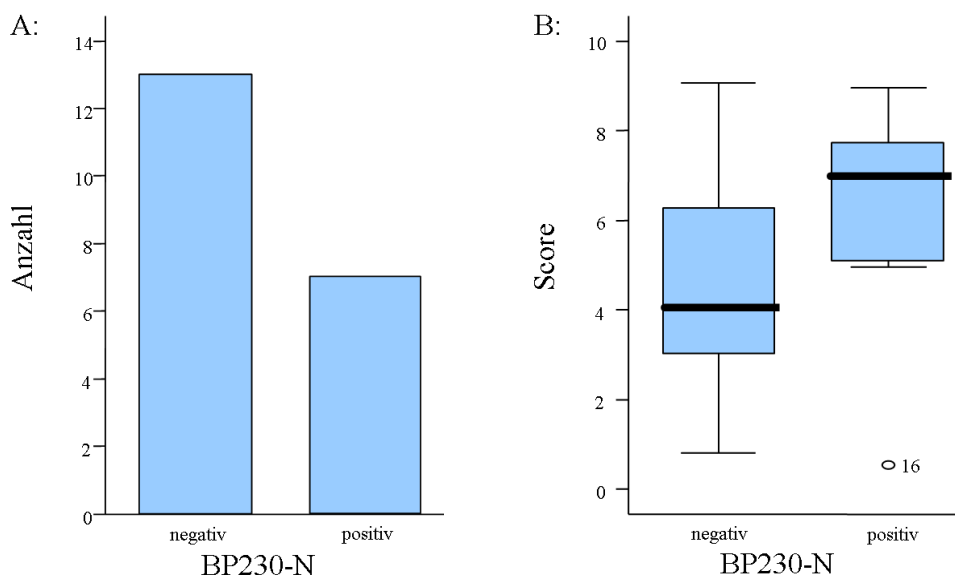


Abb.4.12: Antikörperreaktivität gegen BP230-N (n=20 Patienten):

A: Häufigkeit der positiven (7 Patienten = 35%) und negativen (13 Patienten = 65%) BP230-N-IgG-Antikörpernachweise

B: Assoziation der Antikörperreaktivität (positiv vs. negativ) mit der Höhe des Scores: Median (positiv) =7,0; Median (negativ) =4,0; $p=0,1889$; KI={-1,25; +4,25}; Punktwert: 2 Scorepunkte

Eindeutiger stellt sich die Situation für BP230-C1 dar (Abbildung 4.13). Das Ergebnis entspricht dem des Gesamtkollektivs: Anhand der statistischen Auswertungen, die einen hohen p-Wert in Zusammenhang mit einem fast gleichmäßig die Null umfassenden KI demonstrieren, ist erneut die Annahme der Nullhypothese indiziert. Es lässt sich somit keine Assoziation klinischer und BP230-C1-spezifischer serologischer Daten feststellen. Da das KI erstmals etwas weiter in den negativen als in den positiven Bereich reicht, ist der Punktwert, der die Verschiebung der Verteilungen gegeneinander schätzt, negativ. Dies äußert sich in einer Umkehr der Boxenkonstellation innerhalb des Boxplots.

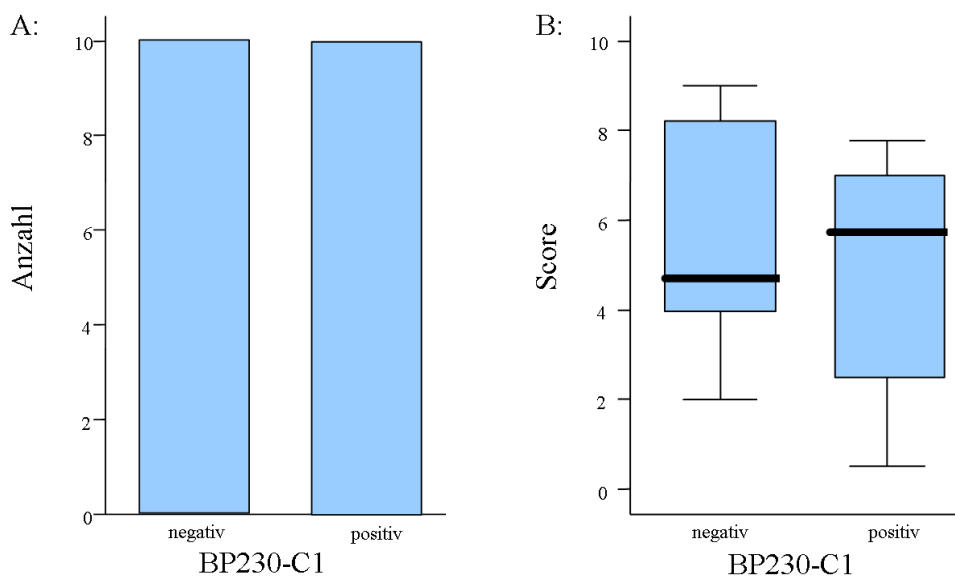


Abb.4.13: Antikörperreaktivität gegen BP230-C1 (n=20 Patienten):

A: Häufigkeit der positiven (10 Patienten = 50%) und negativen (10 Patienten = 50%) BP230-C1-IgG-Antikörpernachweise

B: Assoziation der Antikörperreaktivität (positiv vs. negativ) mit der Höhe des Scores: Median (positiv) =5,8; Median (negativ) =4,8; $p=0,7251$; KI={-3; +2,75}; Punktwert: -0,6 Scorepunkte

Die Analyse des Subkollektivs bestätigt das unterschiedliche Verhalten der beiden Zielantigene BP180 und BP230 bezüglich einer Korrelation klinischer und immunserologischer Daten: Während eine statistisch signifikante Assoziation der Scorehöhe mit der BP180-ex- sowie der BP180-N1-IgG-Autoantikörperreaktivität bestätigt werden kann, wird diese auch im Subkollektiv für das Konstrukt BP230-C1 ausgeschlossen. Bezüglich der Konstrukte BP180-C1 und BP230-N bleibt sie fraglich. In Abbildung 4.14 findet sich eine zusammenfassende Darstellung des Verhaltens von KI, p-Wert und Punktwert dieser Einzelkonstrukte. Auffällig sind insgesamt die breiteren KI im Vergleich zum Gesamtkollektiv, die auf der geringeren Fallzahl des Subkollektivs beruhen.

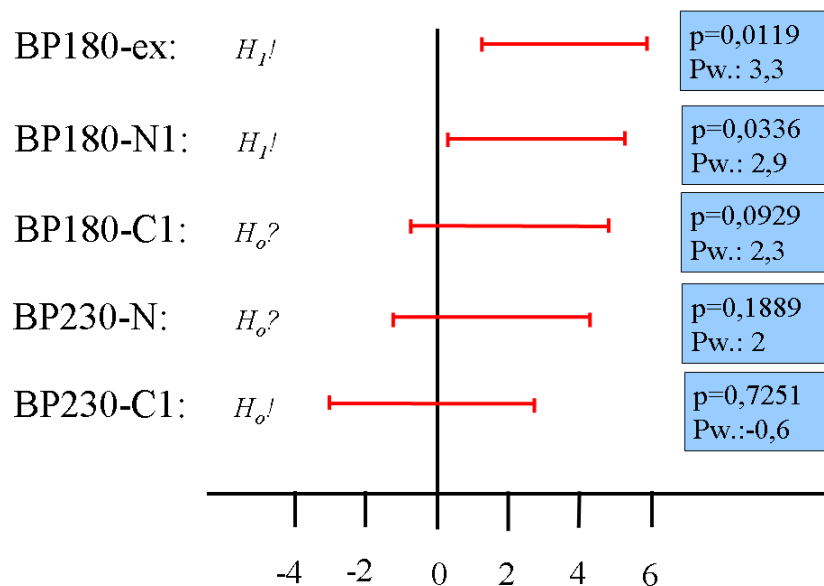


Abb.4.14: Zusammenfassung der statistischen Auswertung des Subkollektivs:

Rote Linien: Konfidenzintervalle, Angabe in Scorepunkten

p: p-Wert, statistische Signifikanz für $p < 0,05$

Pw.: Punktwert, Angabe in Scorepunkten

$H_1!$: Gegenhypothese wird angenommen; $H_0!$: Nullhypothese wird angenommen

$H_0?$: Nullhypothese muss akzeptiert werden, bedarf aber aufgrund der Breite und der Lage des KI weiterer Abklärung mittels größerer Fallzahlen

4.3.3 Antikörperprofil des Subkollektivs

Im Rahmen der Betrachtung des Antikörperprofils der Patienten des Subkollektivs scheint aufgrund der geringen Fallzahl von 20 Patienten eine Einteilung in Gruppen sinnvoll. Dabei sind verschiedene Darstellungen denkbar:

- Zum einen ist eine Einteilung in Gruppen anhand der alleinigen Anzahl positiv getesteter BP180-Konstrukte (0 bis 3 Konstrukte), ungeachtet der BP230-Antikörperreaktivität, möglich (Tabelle 4.7). Vergleicht man diese Gruppen, so zeigt sich folgende Tendenz: Je mehr Konstrukte des BP180 in das Krankheitsgeschehen involviert sind, desto höher ist der durchschnittliche Score. So weist beispielsweise die Gruppe, in der nur gegen eines der drei BP180-Konstrukte eine Antikörperreaktivität besteht, einen durchschnittlichen Score von 3,4 Punkten auf, wohingegen eine kombinierte Antikörperreaktivität gegen alle drei BP180-Konstrukte in einem durchschnittlichen Score von 6,4 Punkten resultiert. Dabei äußerte sich ein zusätzlicher Befall eines oder beider BP230-Konstrukte unterschiedlich: Es lassen sich sowohl Beispiele für eine Erhöhung als auch für einen Abfall des Scores finden.
- Zum anderen kann die Gruppeneinteilung anhand der gleichberechtigten Addition der Anzahl befallener BP180- und BP230-Konstrukte (1 bis 5 Konstrukte) erfolgen (Tabelle 4.8). Bei einer derartigen Darstellung findet sich lediglich im Vergleich des Befalls eines Konstruktes gegenüber dem Befall aller Konstrukte ein deutlicher Unterschied in der Höhe des durchschnittlichen Scores. In den Gruppen, in denen für zwei bis vier Konstrukte ein positiver Antikörpernachweis vorliegt, befinden sich die durchschnittlichen Scores im Bereich von 5,25 bis 5,9 Punkten. Bei diesen lässt sich somit anhand der Gruppenzugehörigkeit keine tendenzielle Aussage über die Höhe des Scores treffen. Eine derartige Einteilung des Antikörperprofils scheint also im Vergleich zu der vorausgegangenen Gruppeneinteilung (in Tabelle 4.7), die nur anhand der Anzahl involvierter BP180-Konstrukte erfolgt ist, nicht sinnvoll.

Zusammenfassend untermauern diese Ergebnisse die Resultate der vorausgegangenen Kapitel, die eine Assoziation von Krankheitsaktivität und Antikörperreaktivität nur für die Konstrukte des BP180 herstellen konnten.

Tab.4.7: Antikörperprofil des Subkollektivs I (n=20):

Gruppeneinteilung anhand der Anzahl positiv getesteter BP180-Konstrukte; MW: Mittelwert

Pos. Konstrukte / Konstruktkombination		Anzahl Patienten	Score-bandbreite	MW (Score)	Score MW	
BP180-Konstrukt(e)	BP230-Konstrukt(e)					
0	-	-	-	-	1,6	
		BP230-C1	2 (10%)	0,75 - 2,5		1,60
1	BP180-ex	-	-	-	3,4	
		BP230-N	-	-		
		BP230-C1	1 (5%)	-		3,75
	BP180-N1	-	1 (5%)	-		3,00
		BP230-N	-	-		-
		BP230-C1	-	-		-
	BP180-C1	-	1 (5%)	-		2,00
		BP230-N	1 (5%)	-		5,00
		BP230-C1	-	-		-
2	BP180-ex + BP180-N1	-	1 (5%)	-	9,00	
		BP230-N	-	-	-	
		BP230-C1	1 (5%)	-	7,00	
		BP230-N + BP230-C1	1 (5%)	-	0,50	
	BP180-ex + BP180-C1	-	-	-	-	
		BP230-N	-	-	-	
		BP230-C1	-	-	-	
		BP230-N + BP230-C1	1 (5%)	-	5,25	
	BP180-N1 + BP180-C1	-	-	-	-	
		BP230-N	-	-	-	
BP230-C1		-	-	-		
BP230-N + BP230-C1		-	-	-		
3	BP180-ex + BP180-N1 + BP180-C1	-	5 (25%)	4,0 - 8,25	5,15	
		BP230-N	1 (5%)	-	9,00	
		BP230-C1	1 (5%)	-	6,25	
		BP230-N + BP230-C1	3 (15%)	7,0 - 7,75	7,50	
Total		20 (100%)				

Tab.4.8: Antikörperprofil des Subkollektivs II (n=20):

Gruppeneinteilung anhand der Anzahl positiv getesteter BP180- und BP230-Konstrukte; MW: Mittelwert

Anzahl positiver BP180- + BP230-Konstrukte	Anzahl Patienten		Score-bandbreite	Score MW
	absolut	relativ (%)		
1	4	20	0,75 - 2,5	1,6
2	3	15	3,75 - 9	5,9
3	6	30	4,0 - 8,25	5,5
4	4	20	0,5 - 9	5,25
5	3	15	7,0 - 7,75	7,5
Total	20	100		

4.3.4 Assoziation des Pemphigoid-Index Wertes mit der Höhe des Scores

Im Folgenden soll nun die Antikörperreaktivität weiter differenziert werden, indem nicht nur *qualitativ* zwischen dem Vorliegen eines positiven gegenüber eines negativen Antikörpernachweises unterschieden wird, sondern indem die *quantitative* Ausprägung der Antikörperreaktivität - quantifiziert als Pemphigoid-Index Wert (PIV) - beleuchtet wird. Die Assoziation des PIV mit der Höhe des Scores wird untersucht:

Die Datengrundlage bildet das Subkollektiv, anhand dessen für jedes Einzelkonstrukt ein Streudiagramm angefertigt wird, wobei auf der x-Achse der Antikörperindexwert (PIV) und auf der y-Achse der zugehörige Score aufgetragen werden (Abbildung 4.15). Blau markiert stellt sich die jeweilige Ausgleichsgerade mit entsprechendem R^2 dar, wobei es sich bei R^2 um ein Bestimmtheitsmaß handelt. Es leitet sich vom Korrelationskoeffizienten R ab und gibt an, wie viel Prozent der Variabilität der abhängigen Variablen (Score) durch die unabhängige Variable (PIV des Einzelkonstrukts) erklärt werden. Damit dient es der Quantifizierung einer Korrelation. Je größer R^2 ist, desto größer ist die Güte der Vorhersagbarkeit.

Allerdings ist nur bei gleichmäßigen Verteilungswolken eine lineare Beschreibung mit der Ermittlung des zugehörigen R^2 sinnvoll. Eine solche lineare Modulierung mit relativ gleichmäßiger Punktverteilung um die Ausgleichsgerade herum ohne größere Lücken in bestimmten Abschnitten der x-Achse zeigt sich für BP180-ex und BP180-N1 (Abbildung 4.15, A und B). Für die Konstrukte BP180-C1, BP230-N und BP230-C1 erscheint eine solche lineare Modulierung nicht sinnvoll, da die Verteilung der Punkte auf der x-Achse sehr ungleichmäßig ist (Abbildung 4.15, C bis E). Es zeigen sich vor allem für die Konstrukte des BP230 große Lücken. Die Mehrzahl der Punkte befindet sich auf der linken Seite der Diagramme, wodurch einzelne jeweils rechts im Diagramm gelegene Punkte das Bild der Ausgleichsgeraden und damit R^2 übermäßig stark prägen. Aus einer Erhöhung der Fallzahl könnte eine gleichmäßigere Verteilung der Punkte auf der x-Achse resultieren, auf Grundlage derer eine sinnvolle lineare Modulierung und entsprechende Bestimmung des R^2 erfolgen könnte.

Betrachtet man nun die Verteilungswolken der Konstrukte BP180-ex und -N1, so lassen sich die in den vorausgegangenen Kapiteln getroffenen Aussagen erweitern (Abbildung

4.15, A und B): Neben der beschriebenen *qualitativen* Assoziation eines hohen Scores mit positivem IgG-Antikörpernachweis und umgekehrt, lässt sich hier außerdem auf *quantitativer* Ebene anhand der Höhe des Antikörperindexwertes eine Aussage über die Größe des Scores treffen. Die Güte der Vorhersagbarkeit stellt sich für BP180-ex aufgrund des größeren R^2 höher dar als für BP180-N1: 63,1% der Variabilität des Scores können mit der Höhe des PIV des BP180-ex erklärt werden. Dies bedeutet, dass hier beispielsweise ein PIV (BP180-ex) von 150 zu 63,1% mit einem Score von 9 Punkten einhergeht (grüne Markierung in Abbildung 4.15, A). Eine Restvariabilität des Scores von 36,9% bleibt. Analog dazu lassen sich Aussagen über BP180-N1 treffen. Allerdings können hier nur 49% der Variabilität des Scores mit dem PIV des BP180-N1 erklärt werden.

Damit werden insgesamt die in den vorausgegangenen Kapiteln beschriebenen Resultate untermauert.

Aufgrund der oben genannten Ausführungen sind derartige Aussagen für die Konstrukte BP180-C1, BP230-N und BP230-C1 bei den vorliegenden Verteilungswolken nicht sinnvoll (Abbildung 4.15, C bis E).

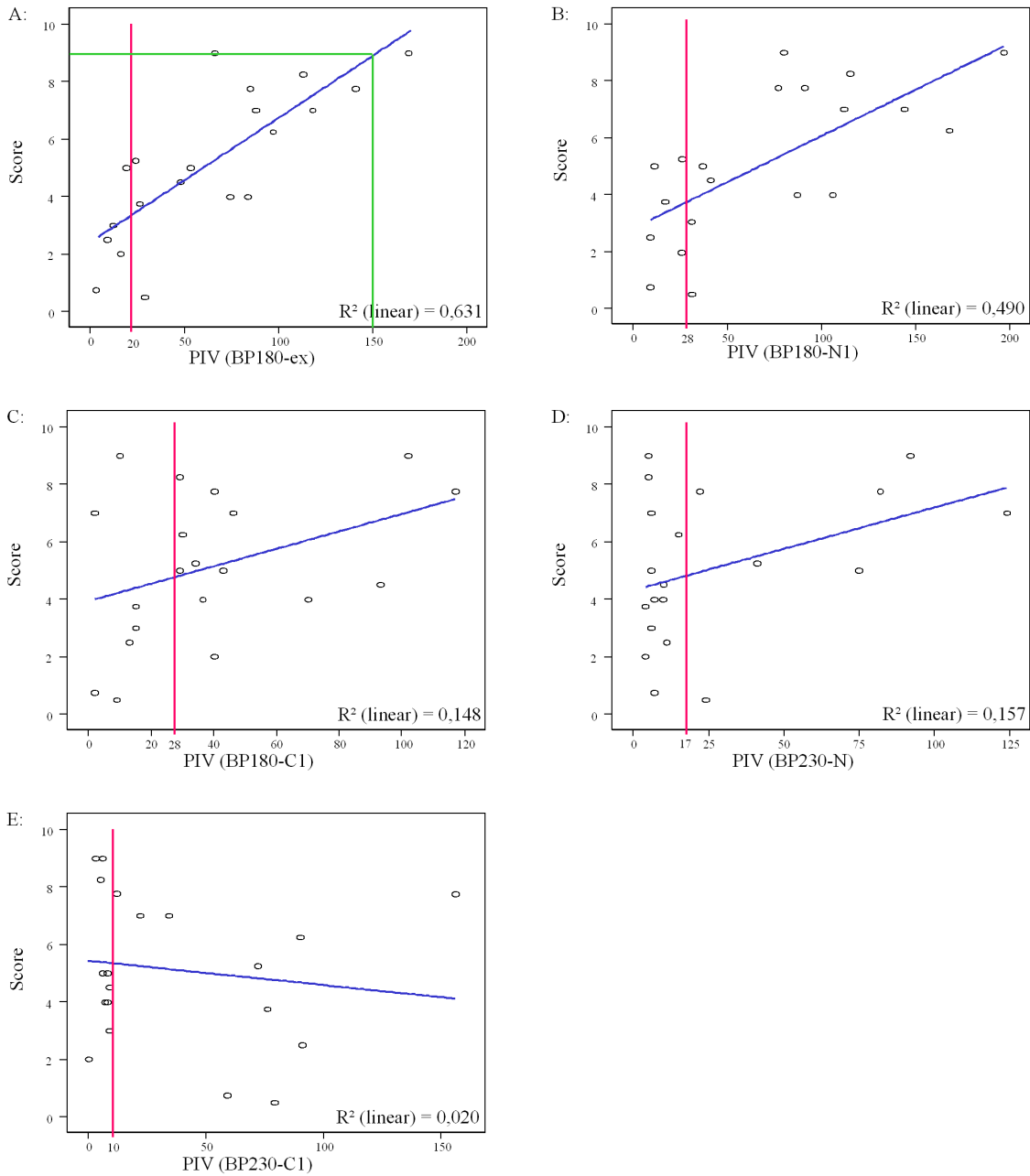


Abb.4.15: Darstellung der Korrelation von PIV und Score für die Einzelkonstrukte im Subkollektiv

A: BP180-ex

B: BP180-N1

C: BP180-C1

D: BP230-N

E: BP230-C1

n=20

blau: Ausgleichsgerade;

pink: PIV-Grenzwert, der ein positives Testergebnis definiert (siehe 3.3.2);

grün: Beispiel siehe Text

4.4 Klinische und immunserologische Daten im Therapieverlauf

Die in den vorausgegangenen Kapiteln betrachteten klinischen und immunserologischen Daten waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose erhoben worden und unterlagen somit keinem Therapieeinfluss. Abschließend wird nun die Assoziation der Scorehöhe zu den Antikörperindexwerten der Einzelkonstrukte unter Berücksichtigung der systemischen Glukokortikoidtherapie im Krankheitsverlauf beschrieben. Hierzu ausgewählt wurden alle Patienten des Subkollektivs, die sich innerhalb eines Zeitraums von mindestens 3 und maximal 14 Monaten nach Diagnosestellung regelmäßig, mindestens drei Mal ärztlich vorgestellt hatten, wobei jeweils eine Kontrolle der Immunserologie erfolgt war. Es ergab sich eine Gruppe von sechs Patienten (Tabelle 4.9).

Im Therapieverlauf zeigt sich eindrucksvoll ein nahezu paralleler Verlauf des Scores und der Antikörperindices der Konstrukte BP180-ex und -N1 (Abbildung 4.16 A und C): In dem Maße, in dem sich der bei Diagnosestellung durchschnittlich schwerwiegende Hautbefall während der Initialphase dramatisch bessert, fallen auch die anfangs deutlich erhöhten Antikörperindexwerte der Konstrukte BP180-ex und -N1. Bereits ein bis zwei Monate nach Therapiebeginn liegen die Scores im Mittel bei 0,85 Punkten, was einem minimalen Hautbefall entspricht, assoziiert mit BP180-ex- und -N1- Antikörperindices von 26,8 und 33, die beide einen grenzwertig positiven IgG-Nachweis im ELISA bedeuten. Am Ende des Beobachtungszeitraums befinden sich alle Patienten in kompletter klinischer Remission, was sich serologisch anhand der negativen, d.h. unterhalb der Schwellenwerte gelegenen IgG-Nachweise beider genannter Konstrukte widerspiegelt. Auch die Linienführung des BP180-C1-Antikörperindexwertes zeigt initial einen Abfall, wobei insgesamt die Bandbreite der Indices deutlich geringer ausfällt als bei BP180-ex und -N1. Der sich der Initialphase anschließende, weitere kontinuierliche Abfall des Scores bis zum Ende des Beobachtungszeitraums lässt sich allerdings nicht anhand der BP180-C1-Antikörperreaktivität nachvollziehen, da diese nach der Initialphase keinen weiteren Abfall ihrer Mittelwerte zeigt.

Die Verläufe der BP230-N- und BP230-C1-Antikörperindexwerte lassen sich deutlich von denen der Konstrukte des BP180 abgrenzen (Abbildung 4.16, A und D): Auch wenn die Antikörperreaktivität initial einen milden Rückgang verzeichnen lässt,

imponieren im weiteren Verlauf scoreunabhängige steigende und fallende Tendenzen, die keine Parallelität zum Verlauf des Scores erkennen lassen.

Betrachtet man abschließend die Prednisolondosierung im Krankheitsverlauf, so zeigt sich eine graduelle Reduktion der systemischen Glukokortikoide entsprechend der klinischen Remission (Abbildung 4.16, A und B).

Somit lassen sich die zuvor genannten Ergebnisse auch unter Therapieeinfluss im Krankheitsverlauf untermauern. Sowohl für das Konstrukt BP180-ex als auch für das Konstrukt BP180-N1 imponiert eine deutliche Parallelität klinischer und immunserologischer Daten, begleitet von einer entsprechenden Reduktion der systemischen Glukokortikoide im Krankheitsverlauf. Diese Assoziation lässt sich zwar weniger deutlich, aber dennoch tendenziell auch für das Konstrukt BP180-C1 erkennen. Demgegenüber findet sich für die BP230-Konstrukte kein derartiger Zusammenhang.

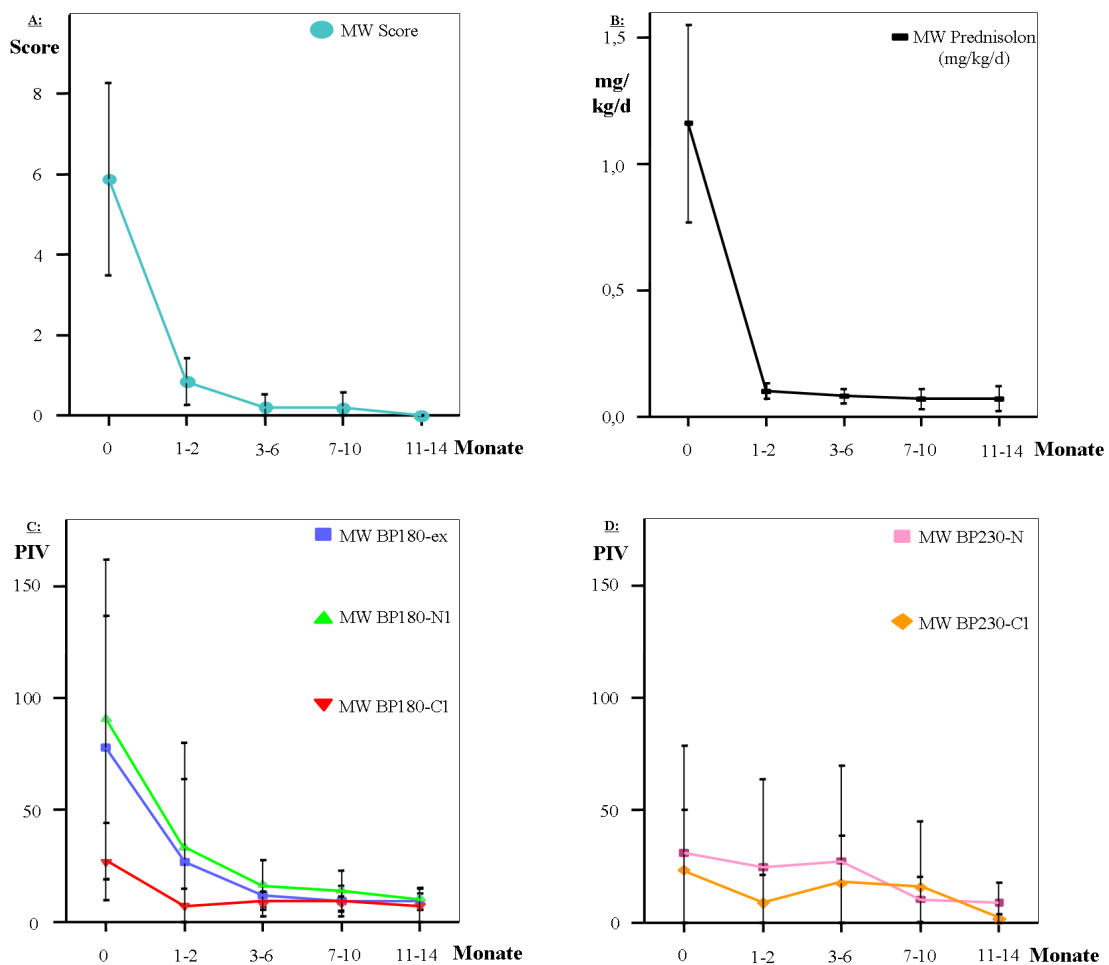


Abb.4.16: Therapieverlauf: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen des Scores (A), des Prednisolonäquivalents in mg/ kg Körpergewicht/ Tag (B) und der Antikörperindexwerte der Konstrukte BP180-ex, -N1 und -C1 (C) sowie der Konstrukte BP230-N und -C1 (D) im Krankheitsverlauf (Monat 0: Erstdiagnose); n=6, zugehörige Daten: siehe Tab.4.9

Tab.4.9: Therapieverläufe: Tabellarische Aufstellung der zugrundeliegenden Daten.

A: Score, Antikörperindexwerte und Prednisolonäquivalent (in mg/ kg Körpergewicht/ Tag) der Patienten 1,2,3,6,9 und 10 im Krankheitsverlauf

B: Zusammenfassung dieser Daten; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung

		Erstdiagnose	Monat 1-2	Monat 3-6	Monat 7-10	Monat 11-14
Patient 1	Score	5	0,75	0	0	0
	BP180-ex	53	15	6	3	11
	BP180-N1	37	9	4	5	11
	BP180-C1	29	8	3	4	15
	BP230-N	6	6	1	3	4
	BP230-C1	8	2	1	0	4
	Prednisolon	1,25	0,125	0,125	0,125	0,125
Patient 2	Score	9	0	0	0	0
	BP180-ex	169	4	9	7	5
	BP180-N1	197	4	13	7	5
	BP180-C1	10	3	12	8	6
	BP230-N	5	2	35	25	19
	BP230-C1	3	0	5	1	0
	Prednisolon	1,7	0,05	0,05	0,05	0,4
Patient 3	Score	2	0,75	0,75	0	0
	BP180-ex	16	11	11	8	11
	BP180-N1	27	27	22	23	15
	BP180-C1	40	3	3	9	0
	BP230-N	4	16	3	6	3
	BP230-C1	0	0	2	2	0
	Prednisolon	1	0,09	0,05	0,05	0,05
Patient 6	Score	7	1,5	0	-	-
	BP180-ex	88	11	9	-	-
	BP180-N1	112	9	5	-	-
	BP180-C1	2	1	3	-	-
	BP230-N	6	5	6	-	-
	BP230-C1	34	29	23	-	-
	Prednisolon	1,25	0,09	0,063	-	-
Patient 9	Score	5,25	-	0	0,75	-
	BP180-ex	24	-	20	19	-
	BP180-N1	27	-	23	20	-
	BP180-C1	34	-	15	12	-
	BP230-N	41	-	9	7	-
	BP230-C1	72	-	57	60	-
	Prednisolon	1,25	-	0,09	0,065	-
Patient 10	Score	7	1,25	0,5	-	-
	BP180-ex	118	93	15	-	-
	BP180-N1	144	116	32	-	-
	BP180-C1	46	20	11	-	-
	BP230-N	124	94	110	-	-
	BP230-C1	22	12	16	-	-
	Prednisolon	0,5	0,125	0,075	-	-
n (Patienten)		6	5	6	4	3
Score	MW	5,88	0,85	0,21	0,19	0
	SD	2,39	0,58	0,33	0,38	0
BP180-ex	MW	78	26,8	11,67	9,25	9
	SD	58,93	37,22	5,05	6,85	3,46
BP180-N1	MW	90,67	33	16,5	13,75	10,33
	SD	71,55	47,22	11,08	9,07	5,03
BP180-C1	MW	26,83	7	7,83	8,25	7
	SD	17,3	7,71	5,46	3,3	7,55
BP230-N	MW	31	24,6	27,33	10,25	8,67
	SD	47,76	39,15	42,35	9,98	8,96
BP230-C1	MW	23,17	8,6	17,33	15,75	1,33
	SD	27,12	12,44	21,27	29,51	2,31
Prednisolon	MW	1,16	0,1	0,08	0,07	0,07
	SD	0,39	0,03	0,03	0,04	0,05

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse retrospektiv erhobener klinischer und immunserologischer Daten von 50 an bullösem Pemphigoid erkrankten Patienten. Diese Analyse erforderte die Entwicklung eines Krankheitsaktivitätsscores, der als Parameter der klinischen Krankheitsschwere diente. Die Erfassung der IgG-Antikörperreaktivität war im Rahmen der Diagnosestellung mittels ELISA unter Differenzierung fünf verschiedener Konstrukte der beiden Zielantigene BP180 und BP230 (siehe Abbildung 3.1) erfolgt, wobei die Resultate in den Patientenakten zugänglich waren.

Es zeigte sich, dass fast ausnahmslos das gesamte Patientenkollektiv zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und somit vor Therapiebeginn eine IgG-Antikörperreaktivität gegen mindestens eines der BP180-Konstrukte präsentierte, während sich nur in ca. zwei Drittel der getesteten Seren entsprechende Reaktivitäten gegen BP230 detektieren ließen. Dabei korrelierten die Autoantikörperreaktivitäten gegen die Konstrukte BP180-ex und -N1 statistisch signifikant mit der Höhe des Krankheitsaktivitätsscores. Für das Konstrukt BP230-C1 konnte eine derartige Assoziation klinischer und serologischer Daten ausgeschlossen werden, wohingegen sie bezüglich der Konstrukte BP180-C1 und BP230-N fraglich blieb. Insgesamt fanden diese Ergebnisse sowohl anhand der Antikörperprofile des Gesamt- und des Subkollektivs als auch im Rahmen der Analyse einer Gruppe von sechs Krankheitsverläufen unter Therapieeinfluss Bestätigung. Somit untermauert die vorliegende Arbeit die Bedeutung der insbesondere gegen die extrazelluläre Domäne (ECD) des BP180 gerichteten Autoantikörperreaktivität hinsichtlich der Krankheitsaktivität.

Voraussetzung für die Durchführung entsprechender Korrelationsanalysen war die Quantifizierung des Hautbefundes mittels eines Krankheitsaktivitätsscores, der anhand der in den Patientenakten dokumentierten Beschreibungen der Effloreszenzen berechnet werden konnte. In der Literatur finden sich zahlreiche Punktesysteme zur Erfassung der Krankheitsschwere bei blasenbildenden Dermatosen wie dem BP oder dem Pemphigus (siehe 1.7). Die Vorgehensweisen der verschiedenen Arbeitsgruppen gestalten sich dabei ganz unterschiedlich. So lassen sich sowohl einfach als auch komplex strukturierte Krankheitsaktivitätsscores finden. Da ein Schleimhautbefall beim BP - im

Vergleich zum Pemphigus - eine untergeordnete Rolle spielt, wurden Schleimhautscores im Rahmen der folgenden Überlegungen nicht berücksichtigt. Auf der Grundlage der nachfolgenden Ausführungen von Vor- und Nachteilen publizierter Scores bezüglich der Anwendbarkeit auf eine retrospektive Datenerhebung wurde ein neuer Score entwickelt mit dem Ziel, die Krankheitsaktivität so differenziert wie retrospektiv möglich und gleichzeitig sinnvoll zu erfassen.

So evaluieren die Arbeitsgruppen um Agarwal und Mahajan bzw. um Tsuji-Abe (siehe 1.7) den kutanen Befall beim Pemphigus bzw. beim BP hauptsächlich auf der Grundlage der prozentualen Ausdehnung der Läsionen bezogen auf die Gesamtkörperoberfläche des Patienten (Agarwal *et al.*, 1998; Mahajan *et al.*, 2005; Tsuji-Abe *et al.*, 2005). Dabei werden Gruppen gebildet, anhand deren Zugehörigkeit eine grob gestaffelte Punktevergabe bis maximal 4 bzw. 6 Punkte erfolgt. Problematisch hierbei ist zum einen eine derartige retrospektive Einschätzung des prozentualen Hautbefalls, zum anderen die Tatsache, dass kleinere Unterschiede nicht zum Tragen kommen, da weite klinische Bandbreiten zu Gruppen zusammengefasst sind. Außerdem finden die verschiedenen Qualitäten der präsentierten Effloreszenzen keine Beachtung. Andere Scores orientieren sich an der Anzahl involvierter, definierter Körperareale. So kalkulieren Herbst *et al.* anhand einer Kombination der Anzahl befallener Areale sowie der erforderlichen Therapie einen Pemphigus-Punktwert (Herbst *et al.*, 2000). Eine Definition von Körperarealen, mittels derer die in den Akten dokumentierten Effloreszenzen zugeordnet werden können, scheint für eine retrospektive Datenerhebung praktikabler und daher sinnvoller als die Schätzung des prozentualen Hautbefalls (s.o.). Allerdings finden bei dem alleinigen Zählen befallener Areale weder die Dichte und somit die Quantität der Effloreszenzen pro Areal noch deren Qualität Beachtung.

Weiterhin gibt es Scores, die die absolute Anzahl von Erosionen bzw. die Anzahl täglich neu auftretender Blasen berücksichtigen (Agarwal *et al.*, 1998; Harman *et al.*, 2001). Nachteilig hierbei ist einerseits, dass die Anzahl der Effloreszenzen nicht zwangsläufig deren gesamte Ausdehnung bzw. Krankheitsaktivität widerspiegelt, da die einzelnen Läsionen eine deutliche Größendifferenz zeigen können. Andererseits lag in den vorliegenden Akten keine Auszählung der Effloreszenzen vor, eine derartige retrospektive Erfassung war daher nicht möglich.

Komplexer gestaltete Scores setzen sich z.T. aus mehreren Teilscores zusammen. So erfasst bspw. der „Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score“ (ABSIS, siehe

1.7) äußerst differenziert sowohl den Haut- als auch den Schleimhautbefall beim Pemphigus (Pfütze *et al.*, 2007). Der kutanen Evaluation liegt dabei die Schätzung des prozentualen Hautbefalls bezogen auf die Gesamtkörperoberfläche des Patienten zu Grunde. In Abhängigkeit von der Qualität der Effloreszenzen werden unterschiedliche Gewichtungsfaktoren verwendet, mit welchen der prozentuale Anteil der involvierten Gesamtkörperoberfläche multipliziert wird: Dabei wird der prozentuale Hautbefall anhand der 9er-Regel eruiert, welche die Handfläche des Patienten einem Prozent seiner Gesamtkörperoberfläche gleichsetzt. Dieser Wert geht anschließend direkt - d.h. ohne eine Gruppenzusammenfassung - in die weitere Berechnung ein. Auch kleine Unterschiede des klinischen Status werden dadurch erfasst. Bei nicht vorhandener Fotodokumentation war eine fehlerfreie retrospektive Einschätzung des prozentualen Hautbefalls mittels der 9er-Regel im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch schwer möglich. Allerdings lieferten die Aktendokumentationen eine Differenzierung verschiedener Qualitäten der Effloreszenzen, denen somit auch bei der retrospektiven Evaluation eine unterschiedliche Gewichtung zukommen konnte.

Weiterhin präsentieren Di Zenzo *et al.* einen BP-Score (siehe 1.7), der ebenfalls aus mehreren Elementen besteht (Di Zenzo *et al.*, 2008): Die prozentuale Ausdehnung der Effloreszenzen wird anhand der 9er-Regel quantitativ bestimmt und zu Gruppen zusammengefasst. Eine derartige Kalkulation gestaltet sich aus oben genannten Gründen retrospektiv problematisch. Weiterhin wird die Krankheitsaktivität anhand der Anzahl neu auftretender Blasen innerhalb von zwei Tagen kalkuliert. Mittels der vorliegenden Aktendokumentationen war diese Erhebung retrospektiv - ebenso wie die Ermittlung des subjektiven Pruritus-Teilscores – nicht möglich.

Da die Scoreberechnung der vorliegenden Arbeit auf der Grundlage von Aktendokumentationen erfolgte, war es notwendig einen neuen Score zu entwickeln, der speziell an die Bedürfnisse einer retrospektiven Datenerhebung angepasst war, aber gleichzeitig die Vorzüge etablierter Scores beinhaltet. Bei der Festlegung des Grundgerüsts dieses Scores schien eine Einteilung der Körperoberfläche in Areale sinnvoll, da eine Benennung krankheitsinvolvierter Körperregionen einen wesentlichen Bestandteil der dermatologischen Aktendokumentation darstellt. Es wurde eine Aufteilung der Körperoberfläche in 10 Areale gewählt. Da die Höhe des Scores aber nicht nur an der Anzahl befallener Areale festgemacht werden sollte, sondern die

klinische Präsentation jedes Areals ganzheitlich einfließen sollte, wurde eine weitere Untergliederung anhand folgender Überlegungen vorgenommen:

- Unter dem Gesichtspunkt, dass einzeln stehende Läsionen eine andere Krankheitsschwere widerspiegeln als dicht an dicht stehende Blasen, kam der Dichte und somit der *Quantität* der Effloreszenzen eine unterschiedliche Gewichtung zu. So wurde eine Differenzierung zwischen multiplen und vereinzelt Hauterscheinungen vorgenommen. Lagen innerhalb eines Areals teils multiple und teils vereinzelt Erscheinungen vor, so wurden multiple Effloreszenzen gewertet. Gleiches galt, wenn sich keine Aussage zur Dichte der Effloreszenzen fand.
- Des Weiteren sollte der Punktwert jedes befallenen Areals die *Qualität* der sich darauf befindlichen Effloreszenzen einbeziehen. Ein hochakut erkrankter Patient präsentiert sich klinisch anders, als ein Patient, dessen Effloreszenzen sich bereits in Abheilung befinden. Außerdem können verschiedene Areale eines Patienten Läsionen unterschiedlicher Krankheitsstadien darbieten. Für die Zugehörigkeit zu einem aktiven Krankheitsstadium wurden hier blasige und erosive Hauterscheinungen gewertet. Das Vorhandensein von Krusten indizierte die Annahme eines in Abheilung befindlichen Krankheitsstadiums. Lagen Effloreszenzen verschiedener Stadien nebeneinander innerhalb eines Areals vor, so wurde der schwerwiegendere Befund gewertet.

Die detaillierte Berechnung des Scores findet sich in 3.2. Jedes Areal erlangte anhand der Staffellungen einen Punktwert von minimal 0 und maximal 1 Punkt. Bei 10 Arealen wurde die Krankheitsaktivität insgesamt somit auf einer Messleiste von 0 bis 10 Punkten eingeordnet.

Bei der Scoreermittlung ergaben sich folgende Probleme: Einerseits fanden sich in den Akten wiederholt Begrifflichkeiten, die nicht primär denen der Scoreermittlung entsprachen, sondern in unterschiedlicher Ausdrucksweise die Lokalisation, Quantität oder Qualität der Effloreszenzen beschrieben. Zur Lösung dieses Problems erfolgte eine sinnvolle und einheitliche Interpretation, deren Festlegung sich in Tabelle 3.2 findet. Dies trug wesentlich zur Objektivierung und Wiederholbarkeit der Berechnungen bei. Außerdem erfolgte die Berechnung des Scores für alle Patienten zeitnah.

Andererseits stellte sich als problematisch heraus, dass der Hautbefall unterschiedlich differenziert dokumentiert worden war, da die Befundung durch verschiedene Ärzte erfolgt war. Die bei der Punktevergabe in der Kategorie der Qualität ausschlaggebenden Bezeichnungen wie „Blasen“, „Erosionen“ und „Krusten“ fanden sich jedoch als konsistente Bestandteile in allen verwendeten Patientenakten, da die Beschreibung der Hauterscheinungen des BP mit diesen Begriffen gängig ist. Ebenso waren die Begriffe „multipel“ und „vereinzelt“ regelmäßig auftretende Benennungen. Eine Definition einer exakten Anzahl an Erscheinungen für das Zutreffen der Bezeichnungen „multipel“ bzw. „vereinzelt“ ist dabei nicht formulierbar. Die Zuordnungsgrenze zwischen diesen deskriptiven Attributen ist fließend und unterscheidet sich vermutlich von Arzt zu Arzt. Da jedoch alle Dokumentationen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hertl erfolgt waren, ist insgesamt von einer einheitlichen Interpretation und Beschreibung der Effloreszenzen auszugehen.

In der Vergangenheit beschäftigten sich bereits mehrere Forschungsgruppen mit der Untersuchung einer möglichen Korrelation klinischer und serologischer Daten. Der folgende Abschnitt soll einen Überblick wichtiger Studien geben. Dabei kamen verschiedene ELISA-Systeme mit unterschiedlichen Sensitivitäten und Spezifitäten zum Einsatz. Die Erfassung der Krankheitsaktivität erfolgte bei den hier genannten Studien stets auf verschiedene Weise.

Am umfassendsten stellt sich die Datenlage für den Bereich der NC16A-Domäne des BP180 dar (siehe Abbildung 1.3). Dabei handelt es sich um den größten nicht-kollagenösen Abschnitt der ECD des BP180, dem eine besondere Bedeutung im Rahmen der Pathogenese des BP zugesprochen wird. Die Mehrzahl der Patientenseren aller im Folgenden genannten Studien wies eine Immunreaktivität gegen dieses Epitop auf. Dabei konnte übereinstimmend eine entsprechende positive Assoziation zur Krankheitsschwere beschrieben werden:

So konnten Schmidt *et al.* unter Verwendung eines prokaryotischen ELISA eine statistisch signifikante Korrelation der Krankheitsaktivität zur Höhe BP180-NC16A-spezifischer Antikörperindexwerte sowohl zum Zeitpunkt der Erstdiagnose als auch im Verlauf der ersten 8 Therapiewochen nachweisen (Schmidt *et al.*, 2000a). Die Staffelung der Krankheitsaktivität war mittels eines von 0 bis 3 reichenden Scores anhand der Anzahl gezählter Blasen und Erosionen erfolgt (siehe 1.7). Bei deutlich

differenzierterer Erfassung der Krankheitsaktivität ließ sich auch in der vorliegenden Arbeit eine Korrelation der Höhe des Scores zu dem Ausmaß der Antikörperreaktivität gegen das BP180-N1-Konstrukt, welches die NC16A-Domäne umfasst, nachweisen. Diese bestätigte sich bei der Betrachtung einer Gruppe von sechs Krankheitsverläufen unter Therapie anhand der sich parallel darstellenden Linienführung des mittleren Scores und des mittleren BP180-N1-Indexwertes.

Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen Amo *et al.* bei der Untersuchung des Krankheitsverlaufs von 10 Patienten, die ebenfalls annähernd parallel verlaufende Krankheitsaktivitäts- und NC16A-Antikörperindexkurven aufzeigten (Amo *et al.*, 2001). Allerdings erfolgte die Darstellung der Krankheitsaktivitätskurve lediglich anhand einer unskalierten Achse und ist somit vermutlich nur relativ zu werten. Eine Korrelation zur Höhe der Antikörperindexwerte konnte folglich nicht berechnet werden. Des Weiteren belegte die Arbeitsgruppe um Tsuji-Abe zwar eine statistisch signifikante Reduktion der NC16A-ELISA-Indexwerte nach erfolgreicher Therapie gegenüber denen vor Therapiebeginn (Tsuji-Abe *et al.*, 2005). Die Assoziation zur Krankheitsaktivität, welche anhand des prozentualen Hautbefalls einem Scorewert von 0 bis 4 Punkten zugeordnet war (siehe 1.7), wurde allerdings nur bei einem Patienten anhand eines Verlaufsdiagramms beschrieben. Es zeigte sich wiederum eine annähernd parallele Linienführung, wobei aber eine statistische Korrelation klinischer und serologischer Daten ausblieb.

Ähnlich stellte sich die Situation bei Kobayashi *et al.* dar (Kobayashi *et al.*, 2002). Auch hier imponierte bei der graphischen Darstellung der NC16A-Indexwerte und der Krankheitsaktivität eine Parallelität im Krankheitsverlauf von 7 Patienten. Die Quantifizierung des Hautbefalls erfolgte dabei für jeden Patienten innerhalb eines Bereichs von 0 bis 4 Scorepunkten, wobei 4 Punkte die maximale Aktivität im individuellen Krankheitsverlauf darstellten (siehe 1.7). Es handelte sich somit um eine relative Einschätzung der Krankheitsschwere, die nicht übertragen werden kann. Ein Vergleich der Scorepunkte verschiedener Patienten ist somit nicht möglich. Die Korrelation wurde wiederum nur beschrieben, eine statistische Auswertung blieb aus.

Deutlich weniger umfangreich stellt sich die Datenlage für die übrigen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Konstrukte dar:

So konnten Haase *et al.* unter Verwendung eines eukaryotischen ELISA bei ca. zwei Drittel der untersuchten Patienten einen Zusammenhang der Höhe des BV13-

Antikörpertiters zur Krankheitsaktivität herstellen (Haase *et al.*, 1998). Dabei handelte es sich bei BV13 um die extrazelluläre Domäne des BP180 abzüglich der 68 C-terminalen Aminosäuren, was in der vorliegenden Arbeit mit BP180-ex vergleichbar wäre. Die Evaluation der Krankheitsaktivität erfolgte anhand der Zuordnung der Patienten in die Gruppen eines disseminierten, limitierten, geringen sowie fehlenden Hautbefalls, wobei die Gruppenkriterien nicht weiter definiert waren. Eine statistische Auswertung der genannten Assoziation blieb aus, es erfolgte lediglich eine Beschreibung des Zusammenhanges. Die vorliegende Arbeit belegte eine enge, statistisch signifikante Korrelation klinischer und BP180-ex-spezifischer serologischer Daten, wodurch die Ergebnisse von Haase *et al.* Bestätigung fanden.

Auf der Grundlage eines prokaryotischen ELISA-Systems analysierte die Arbeitsgruppe um Yoshida die Assoziation der Krankheitsaktivität zur BP230-Antikörperreaktivität (Yoshida *et al.*, 2006). Der hierzu verwendete ELISA testete kombiniert die N- und die C-terminale Region des BP230. Analog zu Kobayashi *et al.* wurde der Hautbefall individuell von 0 bis 4 Scorepunkten gestaffelt (siehe 1.7) (Kobayashi *et al.*, 2002). Dabei zeigten die im aktiven Krankheitsstadium erkrankten Patienten seltener ein positives Testergebnis als die in Remission befindlichen Patienten. Die exemplarische Betrachtung von 10 Patientenverläufen ergab bei der Hälfte der Patienten eine annähernd vergleichbare Linienführung der individuellen Krankheitsaktivitätskurve und des BP230-Index-Verlaufs, die sich allerdings bei den übrigen Patienten nicht finden ließ. Insgesamt schien der BP230-Index als Krankheitsaktivitätsparameter unzuverlässig zu sein. Auch in dieser Studie wurde keine statistische Auswertung der Korrelation klinischer und serologischer Daten vorgenommen. Des Weiteren ist aufgrund der kombinierten Erfassung des N- und C-terminalen Bereichs die Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Arbeit eingeschränkt, da in dieser die Konstrukte BP230-N und BP230-C1 separiert erfasst worden sind, wobei sich für keines der beiden Konstrukte eine signifikante Korrelation zur Scorehöhe herausgestellt hat.

Während sich die oben genannten Studien größtenteils mit der Assoziation klinischer und serologischer Daten im Krankheitsverlauf unter Therapie befassten, lag das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit auf der Untersuchung dieser Assoziation bei nicht-vorbehandelten Patienten innerhalb eines relativ großen Kollektivs von 50 Patienten. Auf der Grundlage statistischer Auswertungen konnte die in den vorausgegangenen Studien angedeutete Assoziation der Krankheitsaktivität mit der

NC16A-Antikörperreaktivität in der vorliegenden Arbeit unter Erfassung des Konstruktes BP180-N1 nicht nur auf deskriptiver Ebene bestätigt werden. Es konnte vielmehr zusätzlich gezeigt werden, dass sich diese Assoziation selbst bei der hier deutlich differenzierteren Evaluation der Krankheitsaktivität im statistisch signifikanten Bereich befand. Gleiches galt für das Konstrukt BP180-ex.

Neben den genannten Autoren beschäftigte sich auch die Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Hertl schon mehrfach mit einer Korrelation klinischer und serologischer Daten beim BP. Dabei wurden u.a. die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen ELISA-Konstrukte (siehe Abbildung 3.1) untersucht.

- Bezüglich der Krankheitsaktivität unterschieden Hofmann *et al.* und Thoma-Uszynski *et al.* allerdings lediglich zwei Gruppen (Hofmann *et al.*, 2002; Thoma-Uszynski *et al.*, 2004). In Abhängigkeit von der Ausdehnung der Effloreszenzen wurden die größtenteils nicht-vorbehandelten Patienten entweder der Gruppe eines lokalisierten oder der Gruppe eines generalisierten Krankheitsbefalls zugewiesen, wobei die Zuordnung in die Gruppe des lokalisierten Befundes erfolgte, wenn sich wenige Blasen präsentierten, die maximal 20% der Gesamtkörperoberfläche involvierten (siehe 1.7). Die Analysen ergaben Folgendes:

Hofmann *et al.* konnten bei Patienten mit generalisiertem Hautbefall signifikant höhere BP180-N1-Antikörperindexwerte nachweisen als bei den Patienten, die einen lokalisierten Hautbefund zeigten (Hofmann *et al.*, 2002). Die entsprechende Untersuchung stellte sich für ein C-terminales Konstrukt der ECD des BP180, welches die 113 C-terminalen AS des BP180-C1 Konstruktes umfasste, als nicht signifikant heraus. Passend hierzu korrelierte in der vorliegenden Arbeit die Scorehöhe mit der BP180-N1-Antikörperreaktivität, wohingegen die Assoziation der Scorehöhe zur BP180-C1-Antikörperreaktivität nicht statistisch signifikant war. Bezüglich des Konstruktes BP180-ex wiesen Thoma-Uszynski *et al.* signifikant höhere BP180-ex-Antikörperindexwerte bei generalisiert gegenüber lokalisiert erkrankten Patienten nach (Thoma-Uszynski *et al.*, 2004). Die vorliegende Studie konnte dies untermauern: Hier bestätigte sich ebenfalls sowohl qualitativ als auch quantitativ die positive Korrelation der BP180-ex-Antikörperreaktivität mit der Krankheitsaktivität.

Weiterhin untersucht wurde eine Assoziation klinischer und BP230-spezifischer serologischer Daten (Thoma-Uszynski *et al.*, 2004). Dabei stellte sich eine statistisch signifikante Korrelation eines lokalisierten Hautbefundes sowohl zur Höhe der BP230-N- als auch zur Höhe der BP230-C1-Antikörperindexwerte dar. Somit handelte es sich um eine inverse Assoziation: Je höher der Antikörperindexwert war, desto eher präsentierte sich ein lokalisierter Befall. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Antikörperreaktivitäten beider BP230-Konstrukte keine Korrelation zur Krankheitsaktivität.

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass die vorliegende Arbeit die Untersuchungsergebnisse von Hofmann *et al.* und Thoma-Uszynski *et al.* bezüglich der Konstrukte BP180-N1 und BP180-ex nicht nur bestätigen konnte (Hofmann *et al.*, 2002; Thoma-Uszynski *et al.*, 2004): Denn obwohl der Evaluation der Krankheitsaktivität in der vorliegenden Arbeit keine dichotome Einteilung (lokalisiert vs. generalisiert), sondern eine lineare Einteilung von 0 bis 10 Scorepunkten zugrunde lag, korrelierten Krankheitsaktivität und BP180-ex/-N1-Antikörperreaktivität. Somit ermöglichten die Daten der vorliegenden Arbeit anhand der gemessenen BP180-ex/-N1-Antikörperindexwerte Rückschlüsse auf die Höhe des Scores, der die Krankheitsaktivität deutlich differenzierter widerspiegelt als die Zugehörigkeit zu der Gruppe eines lokalisierten bzw. eines generalisierten Krankheitsstadium.

- Di Zenzo *et al.* hingegen verwendeten einen Score, der als Summe dreier Einzelscores (siehe 1.7) im prospektiven Versuchsaufbau evaluiert wurde (Di Zenzo *et al.*, 2008): Die Teilscores umfassten zum einen die Krankheitsaktivität, gemessen als Anzahl neu aufgetretener Blasen innerhalb zweier aufeinanderfolgender Tage, außerdem die Krankheitsausdehnung im Sinne der involvierten Gesamtkörperoberfläche sowie das Ausmaß des Pruritus. Angewandt wurde dieser Score in einer multizentrischen Studie, die ein Kollektiv von 49 erstdiagnostizierten und somit nicht-vorbehandelten Patienten umfasste. Die Analyse der Autoantikörperreaktivitäten erfolgte innerhalb fünf verschiedener europäischer Laboratorien, wobei pro- und eukaryotische ELISA-Systeme zum Einsatz kamen, die die Antikörperreaktivitäten gegen unterschiedliche Konstrukte der beiden Zielantigene BP180 und BP230 - u.a. gegen alle in vorliegender Arbeit genannten Konstrukte - erfassten. Interessanterweise wiesen die gemessenen Antikörperreaktivitäten der

verschiedenen pro- und eukaryotischen, korrespondierende Sequenzen umfassenden ELISA eine hohe Übereinstimmung auf, was dem in der Vergangenheit häufig postulierten Vorteil eines eukaryotischen gegenüber eines prokaryotischen Expressionssystem widerspricht (Kidd *et al.*, 1993).

Bei der Korrelation der klinischen und der immunserologischen Daten zeigte sich, dass eine positive statistisch signifikante Korrelation der Krankheitsschwere zu den Antikörperindexwerten verschiedener, die NC16A-Domäne umfassender Konstrukte, bestand. Diese Korrelation wurde u.a. für das in vorliegender Arbeit analysierte Konstrukt BP180-N1 belegt. Der gleiche Nachweis gelang für BP180-ex sowie für eine kurze C-terminale Sequenz der ECD des BP180, wohingegen keine Korrelation für größere eukaryotisch exprimierte C-terminale Epitope - u.a. für BP180-C1 - nachweisbar war. Für die untersuchten Konstrukte des BP230, die auch die Konstrukte der vorliegenden Arbeit umfassten, ließ sich nach statistischen Analysen keine entsprechende Assoziation finden.

Vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigte sich weiterhin, dass ein Antikörpernachweis gegen mindestens eines der BP180-Konstrukte fast ausnahmslos gelang, wohingegen sich nur in 71% der Seren eine entsprechende Reaktivität gegen BP230 detektieren ließ.

Unter den Teilscores, die zur Ermittlung der Krankheitsschwere herangezogen wurden, wies interessanterweise der die Krankheitsaktivität erfassende Teilscore die deutlichste Korrelation zur Serologie auf, gefolgt von dem Maß der Krankheitsausdehnung. Der Pruritus-Teilscore hingegen erbrachte keinerlei Korrelation.

Die vorliegende Arbeit zeigte somit bezüglich aller Konstrukte deutliche Übereinstimmung zu den genannten Ergebnissen. Dabei fällt auf, dass die Gesichtspunkte, die der Berechnung des Scores der vorliegenden Arbeit zugrunde lagen, nämlich Qualität der präsentierten Effloreszenzen sowie deren Quantität, auch wesentlich in den hier zitierten Score von Di Zenzo *et al.* einfließen: Während die Evaluation der Krankheitsaktivität innerhalb der multizentrischen Studie anhand der Anzahl neu aufgetretener Blasen innerhalb zweier aufeinanderfolgender Tage erfolgt war, gelang dies in der vorliegenden Arbeit anhand der qualitativen Differenzierung akuter vs. sich in Abheilung befindlicher Effloreszenzen jedes einzelnen Areals im Sinne unterschiedlicher Krankheitsstadien. Die Krankheitsausdehnung schätzten Di Zenzo *et al.* anhand der prozentual involvierten Gesamtkörperoberfläche, während in

der vorliegenden Arbeit die Dichte und somit die Quantität des Läsionen im Sinne multipler vs. einzelner Effloreszenzen jedes einzelnen der zehn definierten Körperareale Beachtung fand. Insgesamt legen die Ergebnisse der Korrelationsuntersuchungen nahe, dass die Ermittlung der Krankheitsaktivität in der vorliegenden Arbeit - den Möglichkeiten einer retrospektiven Evaluation angepasst - differenziert die wesentlichen Gesichtspunkte erfasste.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und den Resultaten zahlreicher anderer Studien geht somit zusammenfassend hervor, dass das Konstrukt BP180 gegenüber dem Konstrukt BP230 eine übergeordnete Rolle hinsichtlich der Krankheitsaktivität zu spielen scheint. Dies ist vereinbar mit der Theorie des „Epitope spreading“, die für zahlreiche Autoimmunerkrankungen herangezogen wird. Sie postuliert, dass sich im Laufe einer chronischen Erkrankung eine Demaskierung primär verborgener, sekundärer, endogener Epitope entwickeln kann, die sich vom immundominanten Epitop unterscheiden, mit diesem nicht kreuzreagieren und auf demselben oder einem anderen Protein liegen können (Vanderlugt, C. J. *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1998). Hieraus resultiert eine spezifische Immunantwort autoreaktiver B-und/oder T-Lymphozyten gegen die entsprechenden neuen Epitope und somit eine Unterhaltung der Entzündungsreaktion. Das bedeutet, dass sich die Immunantwort im Krankheitsverlauf auf sekundäre Epitope ausbreiten kann, welche aber somit zumindest initial eine geringere Relevanz für die Pathogenese und die Krankheitsaktivität haben. Auf das BP angewandt heißt das, dass es sich bei dem Transmembranprotein BP180 vermutlich um das primäre Autoantigen handelt, dessen gegen die extrazellulären Epitope gerichteten Antikörper entscheidend für die Primärreaktion sind und folglich eine enge Assoziation zur Krankheitsaktivität zeigen. Dem gegenüber werden intrazelluläre Epitope des BP180 sowie das intrazellulär lokalisierte BP230 erst sekundär im Rahmen von Demaskierungsprozessen zugänglich und dabei im Sinne eines intra- bzw. intermolekularen „Epitope spreading“ in das Krankheitsgeschehen involviert, wodurch sie Bedeutung für die Krankheitsaktivität gewinnen. Interessanterweise konnten verschiedene Studien zeigen, dass Antikörperreakтивitäten gegen intrazelluläre Epitope des BP180 bzw. gegen BP230 schon zu Krankheitsbeginn nachweisbar waren (Di Zenzo *et al.*, 2004; Thoma-Uszynski *et al.*, 2004; Di Zenzo *et al.*, 2008). Dabei ließ sich weder für die Antikörperreakтивität gegen extrazelluläre Domänen des BP180 noch für

die Antikörperreaktivität gegen intrazellulär gelegene Epitope des BP180 bzw. BP230 ein Zusammenhang zur Krankheitsdauer herstellen (Di Zenzo *et al.*, 2008). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten zwei Drittel der erstdiagnostizierten Patienten eine IgG-Reaktivität gegen BP230. Dies lässt vermuten, dass Prozesse des „Epitope spreading“ schon zum Zeitpunkt der klinischen Erstmanifestation auftreten können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind vereinbar mit der Theorie des „Epitope spreading“ und untermauern die Bedeutung der insbesondere gegen die ECD des BP180 gerichteten Autoantikörperreaktivität hinsichtlich der Pathogenese und der Krankheitsaktivität: Die vorherrschende Stellung der BP180- gegenüber der BP230-Antikörperreaktivität äußerte sich zum einen darin, dass positive IgG-Nachweise gegen eines oder mehrere BP180-Konstrukte zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bei 92% der Patienten vorlagen (siehe Tabelle 4.4). Hingegen wurden nur 66% der untersuchten Seren initial positiv auf eines oder beide BP230-Konstrukte getestet. Zum anderen war die Krankheitsaktivität wesentlich von dem Ausmaß der BP180-ex- und BP180-N1-Autoantikörperreaktivität abhängig, wohingegen das Vorhandensein oder die Abwesenheit einer BP230-Antikörperreaktivität von untergeordneter Bedeutung für die Krankheitsaktivität war.

Der NC16A-Region wurde im Rahmen dieser Theorie von zahlreichen Autoren besondere Bedeutung als immundominantes Epitop beigemessen (Liu *et al.*, 1993; Amo *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 2002; Sitaru *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit fand sich eine Antikörperreaktivität gegen das Konstrukt BP180-N1, welches die NC16A-Region beinhaltet, in 64% der Fälle im Gesamtkollektiv (siehe Abbildung 4.4) bzw. in 70% der Fälle im Subkollektiv (siehe Abbildung 4.10). Allerdings lag eine BP180-ex-Antikörperreaktivität, die die gesamte ECD des BP180 erfasst, sogar in 84% (siehe Abbildung 4.3) bzw. 75% (siehe Abbildung 4.9) der Fälle vor. Passend dazu konnten Di Zenzo *et al.* zeigen, dass 96% der getesteten Patientenserum zum Zeitpunkt der Erstdiagnose verschiedene außerhalb der NC16A-Domäne gelegene Epitope der ECD des BP180 erkannten (Di Zenzo *et al.*, 2008). Dies lässt darauf schließen, dass nicht nur der N-terminale Bereich der ECD des BP180 die immundominanten Epitope präsentiert, sondern dass vielmehr zusätzliche Epitope auf der ECD liegen, die ebenfalls entscheidend für die Primärreaktion und für das Ausmaß der Krankheitsaktivität sind. Somit stellt ein ausschließlich die NC16A-Domäne repräsentierender ELISA, wie er kommerziell verfügbar ist, vermutlich nicht die optimale Methode der BP-Diagnostik

dar. Auf der Grundlage dieser Überlegungen entwickelten Di Zenzo *et al.* einen kombinierten ELISA (Di Zenzo *et al.*, 2008): Während die maximale Sensitivität der untersuchten Einzel-ELISA in dieser multizentrischen Studie bei 90% lag, gelang mittels eines ELISA, der eine die NC16A-Domäne umfassende prokaryotisch exprimierte Sequenz mit der eukaryotisch exprimierten BP180-ex-Sequenz kombinierte, in 94% der Fälle ein Antikörpernachweis. Wurde zusätzlich BP230-N in die ELISA-Kombination aufgenommen, führte dies mit 100%iger Sensitivität zur Detektion der BP-spezifischen Autoantikörper und damit zur sicheren Diagnosestellung des BP.

Im Umkehrschluss stellt sich nun die Frage, welche Rückschlüsse die genannten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf die Validität des Scores zulassen. Einerseits zeigten die vorliegenden Untersuchungsergebnisse bezüglich der Korrelation klinischer und serologischer Daten eine breite Übereinstimmung zu den Resultaten vorausgegangener Studien, bei denen die Evaluation der Krankheitsaktivität zum Großteil erheblich weniger umfassend erfolgt war. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten statistisch signifikanten Ergebnisse bestehen *trotz* der differenzierteren Erfassung der Krankheitsaktivität und sind somit entsprechend höher zu bewerten. Andererseits zeigte die vorliegende Arbeit auch eine sehr enge Korrelation zu den Resultaten der zitierten multizentrischen Studie, deren Korrelationsanalysen auf der Grundlage einer detaillierten prospektiven Berechnung der Krankheitsschwere beruhten (Di Zenzo *et al.*, 2008). All dies legt nahe, dass die relevanten Parameter der Quantifizierung einer klinischen Krankheitsdarbietung - den Möglichkeiten einer retrospektiven Datenerhebung angepasst - in den Score der vorliegenden Arbeit eingingen. Des Weiteren ist die Berechnung des Scores schnell zu erlernen und dieser im klinischen Alltag leicht anwendbar (beispielsweise anhand der Tabelle 3.1). Die in die Berechnung der *Qualität* der Effloreszenzen involvierten Begrifflichkeiten (Blasen/Erosionen bzw. Krusten) bestimmen zum einen das Krankheitsbild des BP, zum anderen sind sie vom behandelnden Arzt gut zu differenzieren. Da sie sich zudem im Krankheitsverlauf ändern, können sie bei der Berechnung des Scores unterschiedlich gewichtet werden. In der Kategorie der *Quantität* der Läsionen ließe sich bei prospektiver Anwendung eine exakte Zuteilung in die Gruppe eines multiplen gegenüber eines vereinzelt Befundes anhand der Anzahl entsprechender

Effloreszenzen pro Areal definieren. Dies würde zu einer weiteren Verfeinerung der Scoreberechnung führen.

Insgesamt bleibt dennoch kritisch zu bemerken, dass eine retrospektive Quantifizierung der Krankheitsaktivität anhand von Aktendokumentationen, wie sie in der vorliegenden Arbeit erfolgte, einer prospektiven Evaluation immer unterlegen sein wird. Trotz der Festlegung von Arealen, Begrifflichkeiten und Zuordnungen bleibt ein Spielraum, der retrospektiv nicht vollständig erfasst werden kann. Weiterhin ist die Reliabilität der Scoreberechnung zu prüfen. Anhand der oben genannten Kriterien ist allerdings von einer guten Reliabilität auszugehen. Außerdem ließen sich über eine weitere Erhöhung der Fallzahl die Ergebnisse der Korrelationsanalysen der Konstrukte BP180-C1 und BP230-N, die nur im Subkollektiv untersucht wurden, verifizieren.

Die weitere Etablierung dieses Scores könnte im klinischen Alltag von großem Nutzen sein, um den Krankheitsverlauf unter Therapie zu objektivieren und auf Grundlage dessen das therapeutische Management zu optimieren. Anhand exemplarischer Krankheitsverläufe konnte eindrucksvoll gezeigt werden, welche enge Assoziation die BP180-ex- und BP180-N1-Indexwerte zum Krankheitsaktivitätsscore unter Therapie aufwiesen. Es bleibt zu prüfen, ob sich mittels regelmäßiger ELISA-Untersuchungen entsprechende Antikörperindexanstiege aufdecken lassen, die Rückfälle frühzeitig anzeigen könnten. So wäre eventuell eine rechtzeitige milde Therapieanpassung möglich. Den größtenteils alten und multimorbiden Patienten bliebe dadurch womöglich ein härteres und dadurch stärker strapazierendes Therapieregime nach erneutem Ausbruch der Erkrankung erspart, was wiederum Auswirkungen auf die Lebensqualität hätte. Die Relevanz der weiteren Untersuchung dieser Problematik in groß angelegten prospektiven Studien im Therapieverlauf wird hieraus deutlich.

6 Zusammenfassung/ Summary

6.1 Zusammenfassung

Beim bullösen Pemphigoid (BP) handelt es sich um die häufigste erworbene blasenbildende Autoimmunerkrankung des Erwachsenenalters, die organspezifisch die Haut befällt. Der Verlauf ist chronisch entzündlich und geht klassischerweise mit zirkulierenden und gewebsgebundenen Autoantikörpern gegen die hemidesmosomalen Strukturproteine BP180 und BP230, die Bestandteil der Basalmembranzzone der Haut sind, einher. Die Folge ist ein Adhäsionsverlust von Epidermis und Dermis, der sich klinisch in Form von prallen subepidermalen Blasen äußert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Korrelation klinischer und immunerologischer Daten bei Patienten mit BP zu analysieren. Den Untersuchungen lag ein Kollektiv von 50 Patienten zugrunde, deren Daten retrospektiv erhoben wurden. Voraussetzung für die Durchführung entsprechender Korrelationsanalysen war die Entwicklung eines Krankheitsaktivitätsscores, anhand dessen die in den Patientenakten dokumentierten Beschreibungen der Effloreszenzen quantifiziert werden konnten. Unter der Berücksichtigung der Vor- und Nachteile etablierter BP- und Pemphigus- Scores bezüglich der Anwendbarkeit auf eine retrospektive Datenerhebung wurde ein neuer Score entwickelt mit dem Ziel, die Krankheitsaktivität so differenziert wie retrospektiv möglich und gleichzeitig sinnvoll zu erfassen. Die Berechnung dieses Scores beruhte auf einer Einteilung der Körperoberfläche in 10 Areale. Jedem Areal wurde in Abhängigkeit von der Qualität und der Quantität der beschriebenen Effloreszenzen mittels verschiedener Gewichtungen ein Punktwert von 0 bis 1 zugeordnet. Bei 10 Arealen spiegelte sich die Krankheitsaktivität somit insgesamt auf einer Messleiste von 0 bis 10 Punkten wider. Die IgG-Antikörperreaktivität gegen fünf verschiedene Konstrukte der Zielantigene BP180 bzw. BP230 war mittels ELISA erfasst und in den Akten dokumentiert worden. Die Analyse der Daten vor Therapiebeginn ergab Folgendes: Während fast ausnahmslos das gesamte Patientenkollektiv eine Antikörperreaktivität gegen mindestens eines der BP180-Konstrukte präsentierte, ließen sich nur in 66% der getesteten Seren entsprechende Reaktivitäten gegen BP230 detektieren. Es konnte gezeigt werden, dass die IgG-Antikörperreaktivitäten gegen die Konstrukte BP180-ex und BP180-N1 mit der Höhe des Krankheitsaktivitätsscores positiv statistisch signifikant korrelierten. Für das Konstrukt BP230-C1 konnte eine derartige Assoziation klinischer und serologischer Daten statistisch ausgeschlossen werden, wohingegen sie bezüglich der Konstrukte

BP180-C1 und BP230-N fraglich blieb. Insgesamt fanden diese Ergebnisse sowohl anhand der Antikörperprofile als auch im Rahmen der Analyse einer Gruppe von sechs Patienten im langfristigen Therapieverlauf Bestätigung.

BP180 scheint somit gegenüber BP230 eine übergeordnete Rolle hinsichtlich der Krankheitsaktivität zu spielen. Dies ist vereinbar mit der Theorie des „Epitope spreading“, die postuliert, dass die Immunantwort im Krankheitsverlauf nicht auf ein einziges immundominantes Epitop beschränkt bleibt, sondern sich auf andere Epitope innerhalb desselben oder eines anderen Proteins ausbreitet. Auf das BP angewandt heißt das, dass es sich bei dem Transmembranprotein BP180 vermutlich um das primäre Autoantigen handelt, dessen gegen die extrazellulären Epitope gerichteten Antikörper entscheidend für die Primärreaktion sind und folglich eine enge Assoziation zur Krankheitsaktivität zeigen. Dem gegenüber werden intrazelluläre Epitope des BP180 sowie das intrazellulär gelegene BP230 erst sekundär im Rahmen von Demaskierungsprozessen involviert, wodurch sie Bedeutung für die Krankheitsaktivität gewinnen. Der NC16A-Region, die den größten nicht-kollagenösen Bereich der extrazellulären Domäne (ECD) des BP180 darstellt, wurde im Rahmen dieser Theorie von zahlreichen Autoren besondere Bedeutung als immundominantes Epitop beigemessen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten allerdings nicht nur für die Antikörperreaktivität gegen das Konstrukt BP180-N1, welches die NC16A-Domäne umfasst, sondern auch für die BP180-ex-Antikörperreaktivität, die die gesamte ECD abdeckt, eine enge Korrelation zur Krankheitsaktivität. Dies lässt darauf schließen, dass zusätzliche Epitope auf der ECD des BP180 liegen, die ebenfalls für die Pathogenese und das Ausmaß der Krankheitsaktivität von entscheidender Bedeutung sind.

Abschließend stellt sich die Frage, welche Rückschlüsse die genannten Ergebnisse auf die Validität des Scores zulassen. Bezüglich der Korrelation klinischer und serologischer Daten zeigte sich eine breite, statistisch basierte Übereinstimmung zu den Ergebnissen vorausgegangener Studien, bei denen die Evaluation der Krankheitsaktivität größtenteils erheblich weniger umfassend, teilweise aber auch sehr detailliert im prospektiven Versuchsaufbau erfolgt war. Daher ist anzunehmen, dass die relevanten Parameter der Quantifizierung der Krankheitsaktivität in den Score eingingen.

Die weitere Etablierung dieses Scores könnte im klinischen Alltag von großem Nutzen sein, um den Krankheitsverlauf unter Therapie zu objektivieren. Weiterhin bleibt zu prüfen, ob sich mittels regelmäßiger ELISA-Untersuchungen BP180ex- und BP180-N1-Antikörperindexanstiege aufdecken lassen, die Rückfälle frühzeitig anzeigen könnten.

6.2 Summary

Bullous pemphigoid (BP) is the most common autoimmune blistering disorder of the skin that usually affects the elderly. It is characterized by circulating and tissue-bound IgG autoantibodies directed against structural components of the dermo-epidermal basement membrane zone, BP180 and BP230. Clinically, it presents with generalized tense subepidermal blisters arising on apparently normal or erythematous skin.

The goal of this study was to determine whether there is a correlation of clinical and immunological disease parameters in BP. This analysis included 50 patients diagnosed with BP who were seen in the departments of dermatology in Erlangen and Marburg within 6.6 years. The data was assessed retrospectively. In order to quantify the documented skin and mucosae lesions our group developed a new score, which allowed retrospective assessment of disease activity. Therefore the pros and cons of established BP- and pemphigus-scores were taken into account. In summary our new scoring system divides the body surface area into 10 regions. Depending on weighing factors for quality (erosive/bullous versus crusty lesions) and quantity (multiple versus single lesions) of the reported lesions each area is scored with 0 to 1 point. As a result, this score reaching from 0 to 10 can be attributed to every patient. The autoantibody reactivity was measured by ELISA based on five BP180 and BP230 recombinant proteins.

At the time of first diagnosis almost all patients showed antibody reactivity against one or more BP180 domains, while only 66% of the sera recognized at least one BP230 recombinant protein. Correlating clinical and serological parameters we could show a statistically significant positive association between disease activity of BP assessed by the score and IgG reactivity against the entire extracellular domain of BP180 (recombinant BP180-ex) as well as against the NC16A domain of BP180 (covered by the recombinant BP180-N1). In contrast there was no association between disease activity and IgG reactivity against BP230-C1. The correlation remained unclear for antibody reactivity against BP180-C1 and BP230-N recombinant proteins due to small numbers of measurements. Both the antibody profiles and the analysis of a group of six patients in the course of time under treatment confirmed these results.

In summary our results suggest that the autoantibody reactivity against BP180 has a strong association to disease activity in newly diagnosed patients while the antibody reactivity against BP230 plays a secondary role. This is in line with the theory of “epitope spreading” which describes the current concept of autoimmune diseases. According to this theory it has been postulated that the immune response is not restricted to a unique immunodominant epitope, but spreads to involve additional secondary epitopes within the same protein or distinct molecules. That means that the extracellular epitopes of the transmembrane protein BP180 are certainly critical for the initial stage of autoimmune response in BP while processes of intra- and intermolecular epitope spreading involve intracellular epitopes of BP180 and the intracellular located BP230 subsequently in the progress of disease.

It has been postulated that the NC16A domain, which is the largest non-collagenous extracellular domain of BP180, is the immunodominant region in the pathogenesis of BP. We could show that not only the antibody reactivity against BP180-N1, which covers the NC16A domain, but also against the entire ectodomain of BP180 strongly correlated with disease activity. Thus our results provide further support to the concept that the ectodomain of BP180 presents additional epitopes besides NC16A that are pathogenic and therefore associated with disease activity. In contrast, autoantibody reactivity against BP230 seems to play a secondary role in the pathogenesis and consequently shows no association to disease activity.

In terms of correlating clinical and serological data our results reveal a big consensus to results that were obtained in previous studies. In the majority these were based on less detailed evaluations of disease activity but partly also based on precise analysis. Thus we think that our new scoring system is a valid tool in assessing disease activity in BP retrospectively that considers the relevant parameters.

The further establishment of our scoring system might be of great benefit in a prospective clinical setting in order to objectify disease activity. Moreover, it has to be investigated if regular ELISA analysis can show elevated BP180-ex- und BP180-N1-IgG reactivity indicating a relapse.

7 Literaturverzeichnis

- Agarwal, M., R. Walia, et al. (1998). "Pemphigus Area and Activity Score (PAAS)--a novel clinical scoring method for monitoring of pemphigus vulgaris patients." Int J Dermatol **37**(2): 158-60.
- Ahmed, A. R., J. C. Maize, et al. (1977). "Bullous pemphigoid. Clinical and immunologic follow-up after successful therapy." Arch Dermatol **113**(8): 1043-6.
- Amagai, M., T. Hashimoto, et al. (1994). "Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by baculovirus." J Clin Invest **94**(1): 59-67.
- Amo, Y., T. Ohkawa, et al. (2001). "Clinical significance of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid." J Dermatol Sci **26**(1): 14-8.
- Balding, S. D., C. Prost, et al. (1996). "Cicatricial pemphigoid autoantibodies react with multiple sites on the BP180 extracellular domain." J Invest Dermatol **106**(1): 141-6.
- Bastuji-Garin, S., P. Joly, et al. (1996). "Drugs associated with bullous pemphigoid. A case-control study." Arch Dermatol **132**(3): 272-6.
- Bernard, P., P. Aucouturier, et al. (1990a). "Immunoblot analysis of IgG subclasses of circulating antibodies in bullous pemphigoid." Clin Immunol Immunopathol **54**(3): 484-94.
- Bernard, P., C. Prost, et al. (1990b). "Studies of cicatricial pemphigoid autoantibodies using direct immunoelectron microscopy and immunoblot analysis." J Invest Dermatol **94**(5): 630-5.
- Bernard, P., C. Prost, et al. (1992). "The major cicatricial pemphigoid antigen is a 180-kD protein that shows immunologic cross-reactivities with the bullous pemphigoid antigen." J Invest Dermatol **99**(2): 174-9.
- Bernard, P., L. Vaillant, et al. (1995). "Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group." Arch Dermatol **131**(1): 48-52.
- Bernard, P., C. Bedane, et al. (1997). "Anti-BP180 autoantibodies as a marker of poor prognosis in bullous pemphigoid: a cohort analysis of 94 elderly patients." Br J Dermatol **136**(5): 694-8.
- Bhol, K. C., M. J. Dans, et al. (2000). "The autoantibodies to alpha 6 beta 4 integrin of patients affected by ocular cicatricial pemphigoid recognize predominantly epitopes within the large cytoplasmic domain of human beta 4." J Immunol **165**(5): 2824-9.
- Bhol, K. C., L. Goss, et al. (2001). "Autoantibodies to human alpha6 integrin in patients with oral pemphigoid." J Dent Res **80**(8): 1711-5.
- Borradori, L., C. Prost, et al. (1992). "Localized pretibial pemphigoid and pemphigoid nodularis." J Am Acad Dermatol **27**(5 Pt 2): 863-7.
- Borradori, L., P. J. Koch, et al. (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." J Cell Biol **136**(6): 1333-47.
- Borradori, L. and A. Sonnenberg (1999). "Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes." J Invest Dermatol **112**(4): 411-8.
- Briggaman, R. A., W. R. Gammon, et al. (1985). "Epidermolysis bullosa acquisita of the immunopathological type (dermolytic pemphigoid)." J Invest Dermatol **85**(1 Suppl): 79s-84s.

- Budinger, L., L. Borradori, et al. (1998). "Identification and characterization of autoreactive T cell responses to bullous pemphigoid antigen 2 in patients and healthy controls." *J Clin Invest* **102**(12): 2082-9.
- Chan, L. S., A. A. Majmudar, et al. (1997). "Laminin-6 and laminin-5 are recognized by autoantibodies in a subset of cicatricial pemphigoid." *J Invest Dermatol* **108**(6): 848-53.
- Chan, L. S., C. J. Vanderlugt, et al. (1998). "Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases." *J Invest Dermatol* **110**(2): 103-9.
- Chan, L. S., A. R. Ahmed, et al. (2002). "The first international consensus on mucous membrane pemphigoid: definition, diagnostic criteria, pathogenic factors, medical treatment, and prognostic indicators." *Arch Dermatol* **138**(3): 370-9.
- Chen, R., G. Ning, et al. (2001). "Mast cells play a key role in neutrophil recruitment in experimental bullous pemphigoid." *J Clin Invest* **108**(8): 1151-8.
- Chen, R., J. A. Fairley, et al. (2002). "Macrophages, but not T and B lymphocytes, are critical for subepidermal blister formation in experimental bullous pemphigoid: macrophage-mediated neutrophil infiltration depends on mast cell activation." *J Immunol* **169**(7): 3987-92.
- Chorzelski, T. P., J. Sulej, et al. (1983). "IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and coeliac disease." *Ann N Y Acad Sci* **420**: 325-34.
- Colbert, R. L., D. M. Allen, et al. (2004). "Mortality rate of bullous pemphigoid in a US medical center." *J Invest Dermatol* **122**(5): 1091-5.
- Delgado, J. C., D. Turbay, et al. (1996). "A common major histocompatibility complex class II allele HLA-DQB1* 0301 is present in clinical variants of pemphigoid." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16): 8569-71.
- Di Zenzo, G., F. Grosso, et al. (2004). "Characterization of the anti-BP180 autoantibody reactivity profile and epitope mapping in bullous pemphigoid patients." *J Invest Dermatol* **122**(1): 103-10.
- Di Zenzo, G., G. Marazza, et al. (2007). "Bullous pemphigoid: physiopathology, clinical features and management." *Adv Dermatol* **23**: 257-88.
- Di Zenzo, G., S. Thoma-Uszynski, et al. (2008). "Multicenter prospective study of the humoral autoimmune response in bullous pemphigoid." *Clin Immunol* **128**(3): 415-26.
- Dieterich, W., T. Ehnis, et al. (1997). "Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease." *Nat Med* **3**(7): 797-801.
- Dieterich, W., E. Laag, et al. (1999). "Antibodies to tissue transglutaminase as serologic markers in patients with dermatitis herpetiformis." *J Invest Dermatol* **113**(1): 133-6.
- Domloge-Hultsch, N., W. R. Gammon, et al. (1992). "Epiligrin, the major human keratinocyte integrin ligand, is a target in both an acquired autoimmune and an inherited subepidermal blistering skin disease." *J Clin Invest* **90**(4): 1628-33.
- Döpp, R., E. Schmidt, et al. (2000). "IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in Bullous pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity." *J Am Acad Dermatol* **42**(4): 577-83.
- Eming, R., L. Budinger, et al. (2000). "Frequency analysis of autoreactive T-helper 1 and 2 cells in bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay." *Br J Dermatol* **143**(6): 1279-82.
- Farrell, A. M., G. Kirtschig, et al. (1999). "Childhood vulval pemphigoid: a clinical and immunopathological study of five patients." *Br J Dermatol* **140**(2): 308-12.
- Fivenson, D. P., D. L. Breneman, et al. (1994). "Nicotinamide and tetracycline therapy of bullous pemphigoid." *Arch Dermatol* **130**(6): 753-8.

- Franzke, C. W., K. Tasanen, et al. (2004). "Shedding of collagen XVII/BP180: structural motifs influence cleavage from cell surface." J Biol Chem **279**(23): 24521-9.
- Gammon, W. R., J. D. Fine, et al. (1992). "Immunofluorescence on split skin for the detection and differentiation of basement membrane zone autoantibodies." J Am Acad Dermatol **27**(1): 79-87.
- Garcia-Doval, I., A. Conde Taboada, et al. (2005). "Sepsis associated with dermatologic hospitalization is not the cause of high mortality of bullous pemphigoid in Europe." J Invest Dermatol **124**(3): 666-7.
- Gaucherand, M., J. F. Nicolas, et al. (1995). "Major antigenic epitopes of bullous pemphigoid 230 kDa antigen map within the C-terminal end of the protein. Evidence using a 55 kDa recombinant protein." Br J Dermatol **132**(2): 190-6.
- Georgi, M., S. Jainta, et al. (2001). "Autoantigens of subepidermal bullous autoimmune dermatoses." Hautarzt **52**(12): 1079-89.
- Ghohestani, R., J. Kanitakis, et al. (1996). "Comparative sensitivity of indirect immunofluorescence to immunoblot assay for the detection of circulating antibodies to bullous pemphigoid antigens 1 and 2." Br J Dermatol **135**(1): 74-9.
- Ghohestani, R. F., J. F. Nicolas, et al. (1997). "Linear IgA bullous dermatosis with IgA antibodies exclusively directed against the 180- or 230-kDa epidermal antigens." J Invest Dermatol **108**(6): 854-8.
- Giudice, G. J., D. J. Emery, et al. (1992). "Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180." J Invest Dermatol **99**(3): 243-50.
- Giudice, G. J., D. J. Emery, et al. (1993). "Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain." J Immunol **151**(10): 5742-50.
- Grando, S. A., B. T. Glukhenky, et al. (1989). "Mediators of inflammation in blister fluids from patients with pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid." Arch Dermatol **125**(7): 925-30.
- Gudi, V. S., M. I. White, et al. (2005). "Annual incidence and mortality of bullous pemphigoid in the Grampian Region of North-east Scotland." Br J Dermatol **153**(2): 424-7.
- Guillaume, J. C., L. Vaillant, et al. (1993). "Controlled trial of azathioprine and plasma exchange in addition to prednisolone in the treatment of bullous pemphigoid." Arch Dermatol **129**(1): 49-53.
- Haase, C., L. Budinger, et al. (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." J Invest Dermatol **110**(3): 282-6.
- Harman, K. E., P. T. Seed, et al. (2001). "The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels." Br J Dermatol **144**(4): 775-80.
- Hashimoto, T., A. Ishiko, et al. (1996). "A case of linear IgA bullous dermatosis with IgA anti-type VII collagen autoantibodies." Br J Dermatol **134**(2): 336-9.
- Herbst, A. and J. C. Bystry (2000). "Patterns of remission in pemphigus vulgaris." J Am Acad Dermatol **42**(3): 422-7.
- Hertl, M. (2000). "Humoral and cellular autoimmunity in autoimmune bullous skin disorders." Int Arch Allergy Immunol **122**(2): 91-100.
- Hertl, M. and G. Schuler (2002a). "Bullous autoimmune dermatoses. 1: Classification." Hautarzt **53**(3): 207-19; quiz 220-1.
- Hertl, M. and G. Schuler (2002b). "Bullous autoimmune dermatoses. 2: Pathogenesis." Hautarzt **53**(4): 277-85; quiz 285, 287.

- Hertl, M. and G. Schuler (2002c). "Bullous autoimmune dermatoses. 3: Diagnosis and therapy." Hautarzt **53**(5): 352-65; quiz 366-7.
- Hertl, M., R. Eming, et al. (2006). "T cell control in autoimmune bullous skin disorders." J Clin Invest **116**(5): 1159-66.
- Hirako, Y., J. Usukura, et al. (1998). "Cleavage of BP180, a 180-kDa bullous pemphigoid antigen, yields a 120-kDa collagenous extracellular polypeptide." J Biol Chem **273**(16): 9711-7.
- Hofmann, S., S. Thoma-Uszynski, et al. (2002). "Severity and phenotype of bullous pemphigoid relate to autoantibody profile against the NH₂- and COOH-terminal regions of the BP180 ectodomain." J Invest Dermatol **119**(5): 1065-73.
- Hopkinson, S. B., K. S. Riddelle, et al. (1992). "Cytoplasmic domain of the 180-kD bullous pemphigoid antigen, a hemidesmosomal component: molecular and cell biologic characterization." J Invest Dermatol **99**(3): 264-70.
- Hopkinson, S. B., S. E. Baker, et al. (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." J Cell Biol **130**(1): 117-25.
- Joly, P., J. C. Roujeau, et al. (2002). "A comparison of oral and topical corticosteroids in patients with bullous pemphigoid." N Engl J Med **346**(5): 321-7.
- Joly, P., J. Benichou, et al. (2005). "Prediction of survival for patients with bullous pemphigoid: a prospective study." Arch Dermatol **141**(6): 691-8.
- Joly, P. (2008). "Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris." BMJ **337**: a209.
- Jonkman, M. F., M. C. de Jong, et al. (1995). "180-kD bullous pemphigoid antigen (BP180) is deficient in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa." J Clin Invest **95**(3): 1345-52.
- Jordon, R. E., E. H. Beutner, et al. (1967). "Basement zone antibodies in bullous pemphigoid." Jama **200**(9): 751-6.
- Jung, M., W. Kippes, et al. (1999). "Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence." J Am Acad Dermatol **41**(2 Pt 1): 266-8.
- Kidd, I. M. and V. C. Emery (1993). "The use of baculoviruses as expression vectors." Appl Biochem Biotechnol **42**(2-3): 137-59.
- Kiss, M., S. Husz, et al. (2005). "Experimental bullous pemphigoid generated in mice with an antigenic epitope of the human hemidesmosomal protein BP230." J Autoimmun **24**(1): 1-10.
- Kobayashi, M., M. Amagai, et al. (2002). "BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid." J Dermatol Sci **30**(3): 224-32.
- Koster, J., D. Geerts, et al. (2003). "Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin alpha6beta4 important for hemidesmosome assembly." J Cell Sci **116**(Pt 2): 387-99.
- Kramer, M. D. and J. Reinartz (1993). "The autoimmune blistering skin disease bullous pemphigoid. The presence of plasmin/alpha 2-antiplasmin complexes in skin blister fluid indicates plasmin generation in lesional skin." J Clin Invest **92**(2): 978-83.
- Labib, R. S., G. J. Anhalt, et al. (1986). "Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting." J Immunol **136**(4): 1231-5.

- Laffitte, E., M. Skaria, et al. (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." Br J Dermatol **144**(4): 760-8.
- Laffitte, E., P. R. Burkhard, et al. (2005). "Bullous pemphigoid antigen 1 isoforms: potential new target autoantigens in multiple sclerosis?" Br J Dermatol **152**(3): 537-40.
- Langan, S. M., L. Smeeth, et al. (2008). "Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study." BMJ **337**: a180.
- Lever, W. F. (1953). "Pemphigus." Medicine (Baltimore) **32**(1): 1-123.
- Li, K. H., D. Sawamura, et al. (1991). "Genomic organization of collagenous domains and chromosomal assignment of human 180-kDa bullous pemphigoid antigen-2, a novel collagen of stratified squamous epithelium." J Biol Chem **266**(35): 24064-9.
- Lin, M. S., C. L. Fu, et al. (2000). "Epitopes targeted by bullous pemphigoid T lymphocytes and autoantibodies map to the same sites on the bullous pemphigoid 180 ectodomain." J Invest Dermatol **115**(6): 955-61.
- Liu, Z., L. A. Diaz, et al. (1993). "A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180." J Clin Invest **92**(5): 2480-8.
- Liu, Z., G. J. Giudice, et al. (1995). "The role of complement in experimental bullous pemphigoid." J Clin Invest **95**(4): 1539-44.
- Liu, Z., G. J. Giudice, et al. (1997). "A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid." J Clin Invest **100**(5): 1256-63.
- Liu, Z., J. M. Shipley, et al. (1998). "Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid." J Exp Med **188**(3): 475-82.
- Liu, Z., S. D. Shapiro, et al. (2000a). "A critical role for neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid." J Clin Invest **105**(1): 113-23.
- Liu, Z., X. Zhou, et al. (2000b). "The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo." Cell **102**(5): 647-55.
- Liu, Z., N. Li, et al. (2005). "Synergy between a plasminogen cascade and MMP-9 in autoimmune disease." J Clin Invest **115**(4): 879-87.
- Mahajan, V. K., N. L. Sharma, et al. (2005). "Twelve-year clinico-therapeutic experience in pemphigus: a retrospective study of 54 cases." Int J Dermatol **44**(10): 821-7.
- Marinkovich, M. P., T. B. Taylor, et al. (1996). "LAD-1, the linear IgA bullous dermatosis autoantigen, is a novel 120-kDa anchoring filament protein synthesized by epidermal cells." J Invest Dermatol **106**(4): 734-8.
- Mascaro, J. M., Jr., M. Lecha, et al. (1995). "Fetal morbidity in herpes gestationis." Arch Dermatol **131**(10): 1209-10.
- Mc Grath, J. A., B. Gatalica, et al. (1995). "Mutations in the 180-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG2), a hemidesmosomal transmembrane collagen (COL17A1), in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa." Nat Genet **11**(1): 83-6.
- Morel, P. and J. C. Guillaume (1984). "[Treatment of bullous pemphigoid with prednisolone only: 0.75 mg/kg/day versus 1.25 mg/kg/day. A multicenter randomized study]." Ann Dermatol Venereol **111**(10): 925-8.
- Morrison, L. H., R. S. Labib, et al. (1988). "Herpes gestationis autoantibodies recognize a 180-kD human epidermal antigen." J Clin Invest **81**(6): 2023-6.

- Mul, V. E., A. J. van Geest, et al. (2007). "Radiation-induced bullous pemphigoid: a systematic review of an unusual radiation side effect." Radiother Oncol **82**(1): 5-9.
- Mutasim, D. F., N. J. Pelc, et al. (1993). "Cicatricial pemphigoid." Dermatol Clin **11**(3): 499-510.
- Nakatani, C., T. Muramatsu, et al. (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." Br J Dermatol **139**(3): 365-70.
- Nemeth, A. J., A. D. Klein, et al. (1991). "Childhood bullous pemphigoid. Clinical and immunologic features, treatment, and prognosis." Arch Dermatol **127**(3): 378-86.
- Nishie, W., D. Sawamura, et al. (2007). "Humanization of autoantigen." Nat Med **13**(3): 378-83.
- Nonaka, S., A. Ishiko, et al. (2000). "The extracellular domain of BPAG2 has a loop structure in the carboxy terminal flexible tail in vivo." J Invest Dermatol **115**(5): 889-92.
- Oikarinen, A. I., J. J. Zone, et al. (1983). "Demonstration of collagenase and elastase activities in the blister fluids from bullous skin diseases. Comparison between dermatitis herpetiformis and bullous pemphigoid." J Invest Dermatol **81**(3): 261-6.
- Pas, H. H., G. J. Kloosterhuis, et al. (1997). "Bullous pemphigoid and linear IgA dermatosis sera recognize a similar 120-kDa keratinocyte collagenous glycoprotein with antigenic cross-reactivity to BP180." J Invest Dermatol **108**(4): 423-9.
- Patton, T. and N. J. Korman (2006). "Bullous pemphigoid treatment review." Expert Opin Pharmacother **7**(17): 2403-11.
- Perriard, J., F. Jaunin, et al. (1999). "IgG autoantibodies from bullous pemphigoid (BP) patients bind antigenic sites on both the extracellular and the intracellular domains of the BP antigen 180." J Invest Dermatol **112**(2): 141-7.
- Pfütze, M., A. Niedermeier, et al. (2007). "Introducing a novel Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) in pemphigus." Eur J Dermatol **17**(1): 4-11.
- Powell, A. M., Y. Sakuma-Oyama, et al. (2005). "Collagen XVII/BP180: a collagenous transmembrane protein and component of the dermoepidermal anchoring complex." Clin Exp Dermatol **30**(6): 682-7.
- Reunala, T. and P. Collin (1997). "Diseases associated with dermatitis herpetiformis." Br J Dermatol **136**(3): 315-8.
- Reunala, T. (1998). "Dermatitis herpetiformis: coeliac disease of the skin." Ann Med **30**(5): 416-8.
- Romagnani, S. (1992). "Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology." Int Arch Allergy Immunol **98**(4): 279-85.
- Rose, C., W. Dieterich, et al. (1999). "Circulating autoantibodies to tissue transglutaminase differentiate patients with dermatitis herpetiformis from those with linear IgA disease." J Am Acad Dermatol **41**(6): 957-61.
- Roujeau, J. C., C. Lok, et al. (1998). "High risk of death in elderly patients with extensive bullous pemphigoid." Arch Dermatol **134**(4): 465-9.
- Ruhrberg, C. and F. M. Watt (1997). "The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture." Curr Opin Genet Dev **7**(3): 392-7.

- Rzany, B., K. Partscht, et al. (2002). "Risk factors for lethal outcome in patients with bullous pemphigoid: low serum albumin level, high dosage of glucocorticosteroids, and old age." Arch Dermatol **138**(7): 903-8.
- Saraswat, A., K. Bhushan, et al. (2003). "A new grading system for oral pemphigus." Int J Dermatol **42**(5): 413-4.
- Sawamura, D., K. Nomura, et al. (1990). "Bullous pemphigoid antigen (BPAG1): cDNA cloning and mapping of the gene to the short arm of human chromosome 6." Genomics **8**(4): 722-6.
- Sawamura, D., K. Li, et al. (1991). "Human bullous pemphigoid antigen (BPAG1). Amino acid sequences deduced from cloned cDNAs predict biologically important peptide segments and protein domains." J Biol Chem **266**(27): 17784-90.
- Schacke, H., H. Schumann, et al. (1998). "Two forms of collagen XVII in keratinocytes. A full-length transmembrane protein and a soluble ectodomain." J Biol Chem **273**(40): 25937-43.
- Schmidt, E., K. Obe, et al. (2000a). "Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid." Arch Dermatol **136**(2): 174-8.
- Schmidt, E., S. Reimer, et al. (2000b). "Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes." J Invest Dermatol **115**(5): 842-8.
- Shimanovich, I., S. Mihai, et al. (2004). "Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid." J Pathol **204**(5): 519-27.
- Shimizu, H., T. Masunaga, et al. (1995). "Autoantibodies from patients with cicatricial pemphigoid target different sites in epidermal basement membrane." J Invest Dermatol **104**(3): 370-3.
- Sitaru, C., E. Schmidt, et al. (2002). "Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin." J Invest Dermatol **118**(4): 664-71.
- Skaria, M., F. Jaunin, et al. (2000). "IgG autoantibodies from bullous pemphigoid patients recognize multiple antigenic reactive sites located predominantly within the B and C subdomains of the COOH-terminus of BP230." J Invest Dermatol **114**(5): 998-1004.
- Stahle-Backdahl, M., M. Inoue, et al. (1994). "92-kD gelatinase is produced by eosinophils at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the extracellular domain of recombinant 180-kD bullous pemphigoid autoantigen." J Clin Invest **93**(5): 2022-30.
- Stanley, J. R., T. Tanaka, et al. (1988). "Isolation of complementary DNA for bullous pemphigoid antigen by use of patients' autoantibodies." J Clin Invest **82**(6): 1864-70.
- Stinco, G., R. Codutti, et al. (2005). "A retrospective epidemiological study on the association of bullous pemphigoid and neurological diseases." Acta Derm Venereol **85**(2): 136-9.
- Tamada, Y., K. Yokochi, et al. (1995). "Lichen planus pemphigoides: identification of 180 kd hemidesmosome antigen." J Am Acad Dermatol **32**(5 Pt 2): 883-7.
- Taylor, G., V. Venning, et al. (1993). "Bullous pemphigoid and associated autoimmune thrombocytopenia: two case reports." J Am Acad Dermatol **29**(5 Pt 2): 900-2.
- Thoma-Uszynski, S., W. Uter, et al. (2004). "BP230- and BP180-specific autoantibodies in bullous pemphigoid." J Invest Dermatol **122**(6): 1413-22.

- Thoma-Uszynski, S., W. Uter, et al. (2006). "Autoreactive T and B cells from bullous pemphigoid (BP) patients recognize epitopes clustered in distinct regions of BP180 and BP230." J Immunol **176**(3): 2015-23.
- Trueb, R. M., L. Didierjean, et al. (1999). "Childhood bullous pemphigoid: report of a case with characterization of the targeted antigens." J Am Acad Dermatol **40**(2 Pt 2): 338-44.
- Tsuji-Abe, Y., M. Akiyama, et al. (2005). "Correlation of clinical severity and ELISA indices for the NC16A domain of BP180 measured using BP180 ELISA kit in bullous pemphigoid." J Dermatol Sci **37**(3): 145-9.
- Tyagi, S., K. Bhol, et al. (1996). "Ocular cicatricial pemphigoid antigen: partial sequence and biochemical characterization." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14714-9.
- Vanderlugt, C. J. and S. D. Miller (1996). "Epitope spreading." Curr Opin Immunol **8**(6): 831-6.
- Vanderlugt, C. L. and S. D. Miller (2002). "Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy." Nat Rev Immunol **2**(2): 85-95.
- Vassileva, S. (1998). "Drug-induced pemphigoid: bullous and cicatricial." Clin Dermatol **16**(3): 379-87.
- Venning, V. A., P. R. Millard, et al. (1989). "Dapsone as first line therapy for bullous pemphigoid." Br J Dermatol **120**(1): 83-92.
- Venning, V. A. and F. Wojnarowska (1990). "The association of bullous pemphigoid and malignant disease: a case control study." Br J Dermatol **123**(4): 439-45.
- Venning, V. A. and F. Wojnarowska (1992). "Lack of predictive factors for the clinical course of bullous pemphigoid." J Am Acad Dermatol **26**(4): 585-9.
- Verraes, S., W. Hornebeck, et al. (2001). "Respective contribution of neutrophil elastase and matrix metalloproteinase 9 in the degradation of BP180 (type XVII collagen) in human bullous pemphigoid." J Invest Dermatol **117**(5): 1091-6.
- Wieme, N., J. Lambert, et al. (1999). "Epidermolysis bullosa acquisita with combined features of bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid." Dermatology **198**(3): 310-3.
- Willsted, E., B. S. Bhogal, et al. (1990). "Use of 1M NaCl split skin in the indirect immunofluorescence of the linear IgA bullous dermatoses." J Cutan Pathol **17**(3): 144-8.
- Wojnarowska, F., R. A. Marsden, et al. (1988). "Chronic bullous disease of childhood, childhood cicatricial pemphigoid, and linear IgA disease of adults. A comparative study demonstrating clinical and immunopathologic overlap." J Am Acad Dermatol **19**(5 Pt 1): 792-805.
- Wojnarowska, F., P. Whitehead, et al. (1991). "Identification of the target antigen in chronic bullous disease of childhood and linear IgA disease of adults." Br J Dermatol **124**(2): 157-62.
- Wojnarowska, F., G. Kirtschig, et al. (2002). "Guidelines for the management of bullous pemphigoid." Br J Dermatol **147**(2): 214-21.
- Woodley, D. T., R. A. Briggaman, et al. (1984). "Identification of the skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita." N Engl J Med **310**(16): 1007-13.
- Woodley, D. T. (1990). "Immunofluorescence on salt-split skin for the diagnosis of epidermolysis bullosa acquisita." Arch Dermatol **126**(2): 229-31.
- Yancey, K. B. and C. A. Egan (2000). "Pemphigoid: clinical, histologic, immunopathologic, and therapeutic considerations." Jama **284**(3): 350-6.

- Yoshida, M., T. Hamada, et al. (2006). "Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid." J Dermatol Sci **41**(1): 21-30.
- Zillikens, D., H. Erhard, et al. (1994). "[Inflammatory type of epidermolysis bullosa acquisita]." Hautarzt **45**(3): 166-70.
- Zillikens, D., S. Wever, et al. (1995). "Incidence of autoimmune subepidermal blistering dermatoses in a region of central Germany." Arch Dermatol **131**(8): 957-8.
- Zillikens, D., J. M. Mascaro, et al. (1997). "A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid." J Invest Dermatol **109**(5): 679-83.
- Zillikens, D. (2002). "BP180 as the common autoantigen in blistering diseases with different clinical phenotypes." Keio J Med **51**(1): 21-8.
- Zone, J. J., T. B. Taylor, et al. (1990). "Identification of the cutaneous basement membrane zone antigen and isolation of antibody in linear immunoglobulin A bullous dermatosis." J Clin Invest **85**(3): 812-20.
- Zone, J. J., T. B. Taylor, et al. (1998). "The 97 kDa linear IgA bullous disease antigen is identical to a portion of the extracellular domain of the 180 kDa bullous pemphigoid antigen, BPAg2." J Invest Dermatol **110**(3): 207-10.

8 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren

Adamkiewicz	Arnold	Aumüller
Barth	Bartsch	Basler
Baum	Baumann	Becker
Christiansen	Dünne	Eilers
Ellenrieder	Feuser	Fuchs
Görg	Gotzen	Gress
Grimm	Hertl	Höffken
Hofbauer	Hofmann	Hoyer
Jungclas	Kann	Klose
Köhler	Kolb-Niemann	Kretschmer
Kuhlmann	Lill	Lohoff
Maier	Maisch	Moll
Müller	Mutters	Neubauer
Oertel	Renz	Rothmund
Schäfer	Schmidt	Sesterhenn
Steiniger	Vogelmeier	Wagner
Waldegger	Weihe	Werner
Wulf.		

9 Danksagung

Allen voran gilt mein herzlicher Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Michael Hertl für die freundliche Überlassung des Themas sowie die nette, motivierende Betreuung und die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Danken möchte ich ebenfalls dem Korreferenten für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Des Weiteren gebührt mein besonderer Dank meiner Betreuerin Frau Dr. Andrea Niedermeier, die mir stets mit großer Hilfsbereitschaft zur Seite stand und die mich trotz ihres Wechsels nach München weiter unterstützte.

Danken möchte ich außerdem Herrn PD Dr. rer. nat. Hans-Helge Müller, der die statistische Auswertung der Arbeit betreute. Auch Frau Schwietzke, Frau Leinweber und Frau Podstawa möchte ich ganz herzlich für die Durchführung der ELISA und für die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft danken.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Schuler, der mir die Akteneinsicht in der Hautklinik Erlangen ermöglichte.

Besonders danken möchte ich meinem Freund Achim, der mir immer wieder Mut zusprach und mit dem ich alle aufkommenden Fragen diskutieren konnte, was mir sehr viel bedeutet hat und mir eine große Hilfe war. Auch meinen Geschwistern und Freunden danke ich sehr für die Unterstützung während dieser Zeit. Weiterhin herzlich danken möchte ich Inge und Ulrich Kircher, die mir bei der Korrektur der Arbeit eine große Hilfe waren.

Zuletzt, aber ganz besonders, möchte ich meiner Mutter danken, ohne deren Unterstützung weder mein Studium noch diese Arbeit möglich gewesen wären und die mich in der Verwirklichung meiner Pläne und Wünsche stets mit viel Verständnis, Liebe sowie Rat und Tat unterstützt hat.