

Aus dem Institut
für Experimentelle Dermatologie (LIED)
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Enno Schmidt

**Bedeutung von zirkulierenden Anti-BP230 IgE Antikörpern bei
Patienten mit Pemphigoid Erkrankungen**

Inauguraldisseratiton
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- aus der Sektion Medizin -

Vorgelegt von
Beke Esther Linnemann
Aus Duderstadt

Lübeck 2022

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Enno Schmidt
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Frank Noack

Tag der mündlichen Prüfung: 07.10.2022
zum Druck genehmigt. Lübeck, den 07.10.2022
-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Epidemiologie	3
1.2. Klinische Manifestation.....	5
1.3. Zielantigene und Pathophysiologie	7
1.4. Diagnostik	14
1.5. Therapie.....	18
2. Fragestellung	21
3. Material und Methoden	22
3.1. Vorarbeit.....	22
3.2. Patienten und Kontrollen	25
3.3. Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	32
3.3.1. Anti-BP230 IgE ELISA.....	32
3.3.2. Gesamt IgE ELISA.....	33
3.3.3. Anti-BP180 NC16A IgE ELISA.....	34
3.3.4. Anti-BP230 IgG ELISA.....	34
3.3.5. Anti-NP180 NC16A IgG ELISA.....	35
3.4. Bullous Pemphigoid Disease Area Index (BPDAI).....	36
3.5. Statistische Analysen.....	38
3.6. Immunoblot	38
4. Ergebnisse.....	41
4.1. Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	41
4.2. Korrelationsanalysen	48
4.3. Immunoblot	57
5. Diskussion.....	60
6. Zusammenfassung	71
7. Literaturverzeichnis	73
8. Anhang.....	92
8.1. Abkürzungen.....	92
8.2. Material	94
9. Publikationen und Kongressbeiträge.....	98
10. Danksagung	99

1. Einleitung

Das bullöse Pemphigoid (BP) gehört zu der Gruppe der blasenbildenden Autoimmundermatosen und stellt in dieser Gruppe die in Mitteleuropa am häufigsten auftretende Erkrankung dar (Lever, 1953; Schmidt & Zillikens, 2013; Schulze et al., 2013; Joly et al., 2012; Bertram et al., 2009; van Beek et al., 2021b; van Beek et al., 2021a). Der Begriff bullöses Pemphigoid setzt sich aus dem lateinischen Wort „bulla“ und dem griechischen Wort „pemphix“ zusammen, welche beide so viel wie „Blase“ bedeuten (Kneisel & Hertl, 2014). Obwohl der Begriff „Pemphigus“ bereits von Hippokrates verwendet wurde (Lever, 1951), definierte Walter Lever erst im Jahr 1953 die Pemphigoiderkrankungen aufgrund von histopathologischen Merkmalen als eigenständige Erkrankungsgruppe und grenzte sie somit von der Gruppe der Pemphigus-Erkrankungen ab (Lever, 1953). Erst im Jahr 1967, konnten Jordan et al. durch direkte Immunfluoreszenz (DIF) und indirekte Immunfluoreszenz (IIF) erstmals Autoantikörper in der Haut, sowie im Serum von betroffenen Patienten nachweisen (Jordan et al., 1967). Charakteristisch für die Pemphigoid-Erkrankungen sind Antikörper gegen Bestandteile der dermoepidermalen Junktionszone (DEJ). Die Autoantikörper induzieren einem Einstrom von Entzündungszellen, diese bilden reaktive Sauerstoffspezies, neutrophile Elastase und weitere Proteasen, z.B. Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9), wodurch die Proteine der DEJ degradiert werden und somit eine subepidermale Spaltbildung resultiert (Chen et al., 2002).

Im Serum der Patienten lassen sich Autoantikörper gegen BP180 und BP230 nachweisen, die Hauptfraktion bilden hier Antikörper vom Immunglobulin (Ig) G Typ gegen die immunodominante Domäne NC16A des BP180, es lassen sich aber auch Autoantikörper vom IgE und IgA-Typ detektieren (van Beek et al., 2016; Fairley et al., 2007; Kromminga et al., 2000). Klinisch ist das Vorhandensein von prallen Blasen an der Haut charakteristisch. Auch an den Schleimhäuten können Blasen auftreten, diese sind häufig fragiler als an der Haut (Schmidt & Zillikens, 2013; Taquin et al., 2016; Della Torre et al., 2012). Neben dem BP gehören weitere Erkrankungen zur Pemphigoid-Gruppe, diese sind das Schleimhautpemphigoid (SHP), das Pemphigoid gestationis (PG), die lineare IgA-Dermatose, die Epidermolysis bullosa aquista (EBA), das Anti-p200/Laminin γ 1 Pemphigoid und der

Lichen planus pemphigoides (Schmidt & Zillikens, 2013; Kneisel & Hertl, 2014; van Beek et al., 2021b). Eine Übersicht über die Zielantigene und das klinische Bild der genannten Pemphigoiderkrankungen bietet Tabelle 1.

Tab. 1 Darstellung der Zielantigene und klinischen Zeichen der Pemphigoiderkrankungen

	Autoantikörper gegen	Charakteristische Klinische Zeichen
Bullöses Pemphigoid	BP180 NC16A Domäne, BP230	Pralle Blasen und Erosionen, urtikarielle Plaques, starker Juckreiz, ggf. Schleimhautbeteiligung
Schleimhautpemphigoid	BP180, LAD-1, Laminin 332, BP230, $\alpha 6\beta 4$ Integrin, Laminin 311, Typ VII Kollagen	Schleimhautläsionen (z.B. Ulzera, hämorrhagische Krusten), Neigung zur narbigen Abheilung
Pemphigoid gestationis	BP180 NC16A Domäne, BP230	In Schwangerschaft oder postpartaler Phase, urtikarielle Plaques, starker Juckreiz, v.a. periumbillikal
Lineare IgA-Dermatose	BP 180, LAD-1, BP230, Typ VII Kollagen	Pralle Blasen/ Vesikel (häufig Anordnung in Ringen/ Rosetten) und Erosionen, überwiegend ohne Schleimhautbeteiligung
Epidermolysis bullosa acquisita	Typ VII Kollagen	<u>Mechanobullöser Typ:</u> Pralle Blasen entstehen bei mechanischer Belastung <u>Inflammatorischer Typ:</u> ähnelt dem BP oder MMP
Anti-p200-Pemphigoid	Laminin $\gamma 1$ /p200 Protein	Pralle Blasen und Erosionen, überwiegend ohne Schleimhautbeteiligung
Lichen planus pemphigoides	BP180 NC16A Domäne, BP230	Pralle Blasen, die nicht auf Lichen-planus-Läsionen auftreten

Tabelle modifiziert nach Schmidt E. 2013 (Schmidt & Zillikens, 2013)

1.1. Epidemiologie

Die Inzidenz des BP liegt innerhalb von Europa bei bis zu 42,8 pro eine Million Einwohner pro Jahr, in Deutschland beispielsweise liegt sie bei 13,4 pro eine Million Einwohner pro Jahr und in Schleswig-Holstein bei 19,6 pro eine Million Einwohner pro Jahr, wohingegen die Inzidenz in Asien mit 2,6 bis 7,5 pro eine Million Einwohner deutlich geringer ist (Miyamoto et al., 2019; Alpcoy et al., 2015; Wong & Chua, 2002; Langan et al., 2008; Hashimoto et al., 2019; van Beek et al., 2021a). Die Prävalenz in Deutschland wurde mit 259 Betroffenen pro 1 Millionen Einwohner berechnet (Hübner et al., 2016). Das BP betrifft vor allem ältere Menschen (Schulze et al., 2013; Bertram et al., 2009; Marazza et al., 2009). Am häufigsten sind Patienten im 8. Und 9. Lebensjahrzehnt betroffen, wohingegen nur selten Fälle bei Kindern und Erwachsenen unter 50 Jahren berichtet wurden (Taquin et al., 2016; Hübner et al., 2020). Die Inzidenz bei über 80-jährigen liegt bei bis zu 330 pro eine Million Einwohnern (Joly et al., 2012; Marazza et al., 2009; Bertram et al., 2009; Gudi et al., 2005; Langan et al., 2008; Jung et al., 1999; Joly et al., 2012; Joly et al., 2005; van Beek et al., 2021a). Man vermutet, dass unter anderem durch die steigende Lebenserwartung der Bevölkerung und die verbesserte Diagnostik, die Inzidenz in den vergangenen zehn Jahren deutlich zugenommen hat (Schulze et al., 2013). Auch die Zunahme der Risikofaktoren trägt vermutlich zur steigenden Inzidenz bei. Zu den Risikofaktoren für das Auftreten des BP zählen unter anderem die Einnahme von Diuretika (Joly et al., 2012), auch ein vermehrtes Auftreten des BP unter Einnahme von Dipeptidyl-Peptidase-4-Inhibitoren (DPP4I) konnte beobachtet werden (Benzaquen et al., 2018; Varpuluoma et al., 2018; Kridin & Bergman, 2018; Arai et al., 2018; Ständer et al., 2021b). Bei einzelnen Patienten konnten weitere Trigger-Faktoren für das Auftreten des BP festgestellt werden, hierzu zählen verschiedene Traumen, Verbrennungen, Radiotherapie, ultraviolette (UV) Strahlung und Impfungen; es wird hier vor allem die Influenza-Impfung diskutiert (Venning & Wojnarowska, 1995; Walmsley & Hampton, 2011).

Es gibt verschiedene genetische Faktoren, die mit dem Auftreten vom BP vergesellschaftet sind, viele davon sind HLA-assoziiert (Human Leucocyte Antigen) (Delgado et al., 1996; Esmaili et al., 2013; Schwarm et al., 2021). Schwarm et al konnten erst kürzlich anhand von 446 BP Patienten und 433 alters- und

geschlechtsähnliche gesunden Kontrollen nachweisen, dass eine starke Assoziation zwischen dem Nachweis von HLA-DQA1*05:05 und HLA-DRB1*07:01 und dem Auftreten eines Bullösem Pemphigoids besteht (Schwarm et al., 2021).

Das BP ist mit einer 2-3 Mal höheren 1-Jahres-Mortalitätsrate im Vergleich zu der altersgleichen Allgemeinbevölkerung verbunden (Schulze et al., 2013; Cortés et al., 2012; Bertram et al., 2009). Ein höheres Patientenalter und ein schlechter allgemeiner Gesundheitszustand sind mit einer erhöhten Sterblichkeit beim BP Patienten assoziiert (Joly et al., 2005; Roujeau et al., 1998; Rzany et al., 2002). Sowohl Rzany et al. also auch Holtsche et al. stellten fest, dass vor allem Patienten mit niedrigen Serumalbumin-Spiegeln und hohen Glukokortikoiddosen eine höhere Letalität aufwiesen (Rzany et al., 2002; Holtsche et al., 2018).

Im Durchschnitt leidet jeder zweite bis dritte BP Patient an einer neurologischen Erkrankung, beispielsweise Morbus Parkinson, Epilepsie oder Multiple Sklerose (Taghipour et al., 2010; Chen et al., 2011; Langan et al., 2011; Sinéad M. Langan et al.). Diese Assoziation ist dahin gehend interessant, dass die beiden Zielantigene des BP, BP180 und BP230, nicht nur in der Haut sondern auch an verschiedenen Stellen des zentralen Nervensystems zu finden sind (Schmidt & Zillikens, 2013; Claudepierre et al., 2005; Seppänen, 2012). Erst kürzlich konnten Kokkonen et al. einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Anti-BP180 NC16A Antikörpern und einem stärkeren kognitiven Defizit (ermittelt durch den Mini-Mental-State) bei Alzheimer-Patienten nachweisen (Kokkonen et al., 2017). In verschiedenen Studien wurde der Zusammenhang des BP mit Malignomen untersucht, hierbei zeigten sich zunächst teilweise inkonsistente Ergebnisse (Iwashita et al., 2007; Schulze et al., 2015; Cai et al., 2015; Atzmony et al., 2017). Hübner et al. konnten jedoch in einer retrospektiven Studie mit 1743 BP Patienten und einer 5-fach höheren Zahl an Alters- und Geschlechts-gematchten Kontrollen aus der Datenbank einer großen deutschen Krankenkasse (Techniker Krankenkasse) eindeutig zeigen, dass das BP mit hämatologischen Malignomen assoziiert ist (Schulze et al., 2015). Die Einleitung einer Tumorsuche allein aufgrund der Diagnose BP wird nicht empfohlen (Schmidt et al., 2020).

1. 2. Klinische Manifestation

Typischerweise verläuft das BP chronisch rezidivierend, es kann auch spontan abheilen (Schulze et al., 2013). Viele BP Patienten zeigen sich mit generalisiert auftretenden, prallen, serös gefüllten, teils auch hämorrhagischen Blasen (siehe Abb. 1), die sich vor allem an den Ellenbeugen, dem unteren Abdomen, den Intertriginen und den Oberschenkelinnenseiten manifestieren (Schulze et al., 2013). Das Gesicht und der Nacken sind meist ausgespart (Della Torre et al., 2012). Lokal begrenzte Formen betreffen häufig die prätibiale Region (Schmidt & Zillikens, 2013). Unter mechanischer Belastung können die Blasen platzen und Erosionen mit hämorrhagischen Krusten hinterlassen (Schulze et al., 2013). Nach Abheilung bleiben nicht selten Hyper- oder Hypopigmentierungen zurück, Narben sind hingegen untypisch (Schulze et al., 2013; Della Torre et al., 2012).

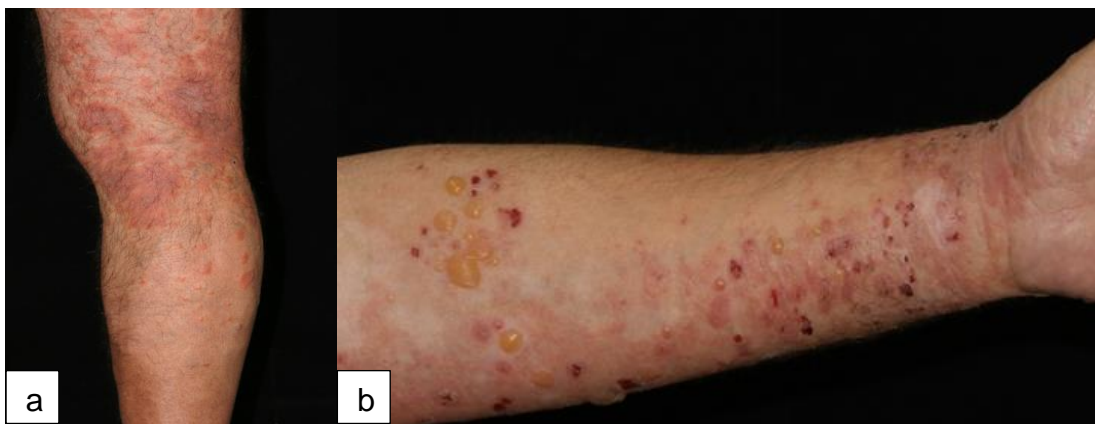


Abb. 1 Klinische Bilder eines 77-jährigen BP Patienten

Urtikarielle Läsionen am Ober- und Unterschenkel (a). Pralle Blasen und Erosionen mit Krusten am Unterarm (b)

Häufig besteht ein quälender Juckreiz, der schon vor Auftreten der Blasen vorhanden sein kann und häufig eine Einschränkung der Lebensqualität der Patienten zur Folge hat (Schulze et al., 2013). Neben den typischen Blasen finden sich vor allem im Anfangsstadium nicht selten unspezifische Hautveränderungen, wie urtikarielle Plaques, erythematöse Papeln, Ekzeme und Erytheme (Schulze et al., 2013; Della Torre et al., 2012). Bei 10-20% der Patienten mit BP zeigen sich orale Schleimhautläsionen, andere Schleimhäute sind eher selten betroffen (Schulze et al., 2013; Della Torre et al., 2012; Ständer et al., 2021a). Es gibt zudem untypische Varianten des BP, bei denen keine Blasen auftreten, hierzu zählen unter

anderem urtikarielle, vesikuläre, dyshidrosiforme, ekzematöse und noduläre Formen (Della Torre et al., 2012), diese Varianten werden häufig nicht erkannt, da sie anderen dermatologischen Erkrankungen ähneln und von der klinischen Präsentation nicht primär an ein BP denken lassen (Lamberts et al., 2018). Eine internationale Gruppe aus Experten auf dem Gebiet des BP erstellte im Jahr 2011 einen Score, den BP Disease Area Index (BPDAl), um das Ausmaß der Erkrankung zu quantifizieren, der BPDAl soll zudem dazu beitragen, Ergebnisse von Studien und Falldarstellungen vergleichbarer zu machen (Murrell et al., 2012). Der BPDAl ist in Abb. 8 zu sehen.

1.3. Zielantigene und Pathophysiologie

Durch verschiedenste Studien konnten in den vergangenen Jahrzehnten einige wichtige pathophysiologische Vorgänge des BP aufgedeckt werden. So versuchten Sams et al. bereits 1971 durch die Übertragung von Plasma von BP Patienten auf drei Rhesusaffen den pathophysiologischen Effekt der Autoantikörper bei der Entstehung des BP zu beweisen. In der Haut der Rhesusaffen ließ sich durch eine direkte Immunfluoreszenz die Bindung der Autoantikörper an der Basalmembran nachweisen, dennoch zeigten sich weder klinisch noch histologisch Läsionen oder Blasen (Sams & Gleich, 1971).

Heute weiß man, dass die Blasenbildung durch Antikörper gegen hemidesmosomale Strukturen ausgelöst wird. Hemidesmosomen sind Multiprotein-Komplexe, die als Bestandteile der DEJ die basalen Keratinozyten der Epidermis mit der Basalmembran verbinden (Abb.2) (Schulze et al., 2013). Zwei Zielantigene konnten bisher beim BP identifiziert werden, BP180 und BP230 (Schmidt & Zillikens, 2013; Schulze et al., 2013).

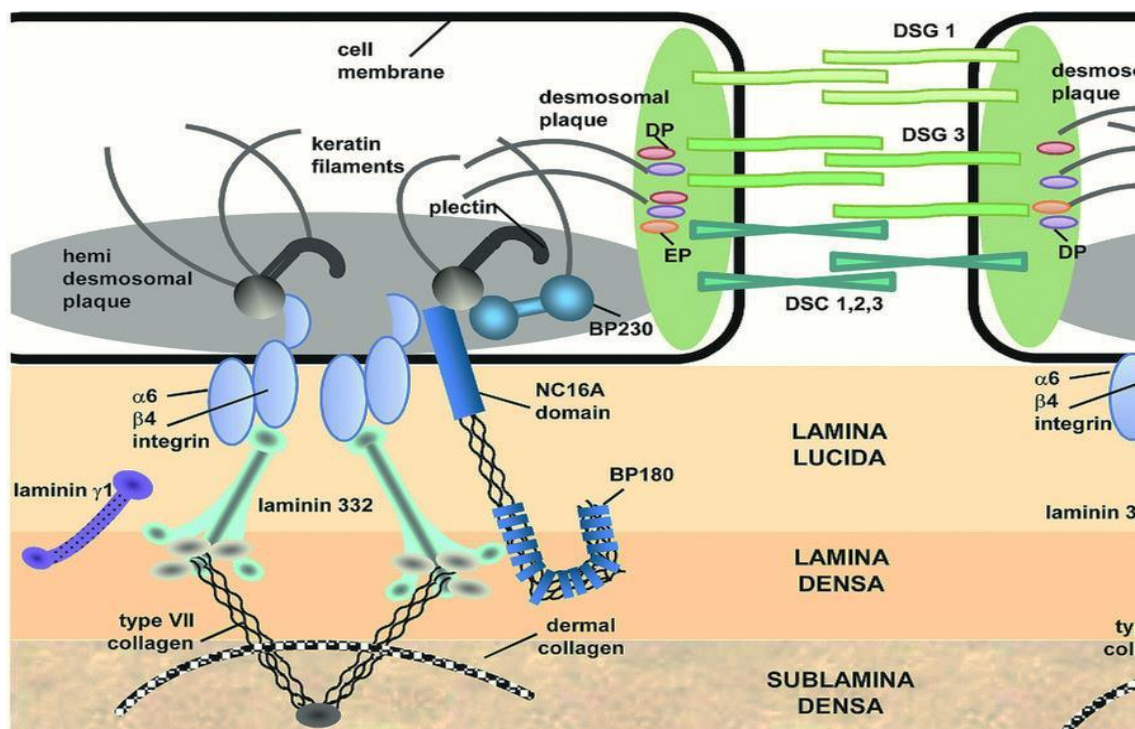


Abb.2: Schematische Darstellung der Zielantigene der Desmosomen (grün) und der dermoepidermalen Junctionszone (blau). DSG, Desmoglein; DSC, Desmocollin; EP, Envoplakin (van Beek et al. 2018).

BP180 (auch bekannt als Typ XVII Kollagen oder BP Antigen 2) ist ein 180kDa großes transmembranöses Glykoprotein, welches sowohl einen im hemidesmosomalen Plaque gelegenen intrazellulären N-Terminus, als auch einen extrazellulären C-Terminus besitzt; dieser durchspannt die Lamina densa komplett, zieht in die Lamina lucida, um schließlich wieder zurück in die Lamina densa zu laufen (siehe Abb. 2) (Schmidt & Zillikens, 2013; van Beek et al., 2018). Der extrazelluläre Abschnitt hat kollagene und nicht-kollagene Anteile, die NC16A Domäne des nicht-kollagenen Anteils wurde als immundominante Region identifiziert. 80-90 % der BP Patienten weisen Autoantikörper gegen ebendiese Domäne auf (Schulze et al., 2013). Den Hauptteil der Antikörper stellt die IgG-Fraktion dar, aber auch IgE und IgA Antikörper konnten nachgewiesen werden (Schmidt & Zillikens, 2013; Kromminga et al., 2000; Döpp et al., 2000). Sowohl IgE- und als auch IgG und IgA- Reaktivität kann nicht nur gegenüber der NC16A Domäne von BP180 bestehen, sondern auch gegenüber anderen Epitopen (Di Zenzo et al., 2004; Ujiie et al., 2010).

Im Jahr 1993 haben Lui et al. in einem Tiermodell die Bedeutung der Autoantikörper gegen BP180 nachweisen können (Liu et al., 1993). Sie injizierten Kaninchen die rekombinante murine NC15A Domäne, die der humanen NC16A Domäne homolog ist. Daraufhin produzierten die Kaninchen Antikörper gegen dieses Fragment (Liu et al., 1993). Die so von den Kaninchen gewonnenen Antikörper wurden neonatalen Mäusen injiziert, woraufhin diese nach mechanischer Manipulation Blasen zeigten (Liu et al., 1993). Histologisch ließen sich, neben einer subepidermalen Spaltbildung, Neutrophile-Infiltrate und C3-Komplementablagerungen darstellen (Liu et al., 1993; Chen et al., 2002).

Anhand von Mäusen mit einem Mangel an verschiedenen entzündlichen Zelltypen konnten Chen et al. zeigen, dass Mastzellen, Makrophagen und Neutrophile, nicht aber T- und B-Lymphozyten, eine direkte Rolle bei der subepidermalen Blasenbildung beim experimentellen BP spielen. Anti-BP180-Autoantikörper lösen bei Wildtyp-Mäusen und Mäusen, denen T-, B- oder sowohl T- als auch B-Zellen fehlen, Hautblasen aus, während sie bei Mäusen, denen Mastzellen, Makrophagen oder Neutrophile fehlen, keine Läsionen hervorrufen. Die Quantifizierung der Krankheitsschwere bei diesen Mäusen zeigte, dass Mastzellen und Neutrophile eine Schlüsselrolle beim experimentellen BP spielen (Chen et al., 2002).

Während wesentliche pathophysiologische Mechanismen beim BP Fc γ -Rezeptor vermittelt sind, gibt es auch Untersuchungen, die auf Fc γ -Rezeptor unabhängige Faktoren hinweisen. So konnten Messingham et al. im Jahr 2011 anhand von kultivierten humanen Keratinozyten eine Fc γ -unabhängige Produktion von IL-6 und IL-8 nach Stimulation mit Anti-BP180 IgG und IgE Antikörpern nachweisen (Messingham et al., 2011). Ähnliche Beobachtungen machten Schmidt et al. für die Anti-BP180 IgG Antikörper bereits im Jahr 2000 (Schmidt et al., 2000b). In einem kultivierten humanen Hautmodell konnten Messingham et al. zudem zeigen, dass es bei Stimulation mit Anti-BP180 IgG und IgE Antikörpern zu einem Fc γ -unabhängigen Verlust von Hemidesmosomen führt, welcher schließlich zur Blasenbildung beiträgt (Messingham et al., 2011).

Eine Degranulation von Mastzellen bewirkt eine Einwanderung von weiteren Entzündungszellen, wie neutrophilen Granulozyten (Chen et al., 2002). Diese neutrophile Aktivierung führt zu einer Freisetzung von potentiell gewebeschädigenden Enzymen, wie neutrophile Elastase und Matrix-Metalloproteinase-9, was ein Verlust der Bindung der basalen Keratinozyten mit der Basalmembran zur Folge hat und schließlich zur Blasenbildung führt (Chakievska et al., 2019; van Beek et al., 2016; Sadik & Schmidt; Schmidt & Zillikens, 2013).

Liu et al. konnten im Jahr 1995 nachweisen, dass Mäuse, die zuvor mit Kobragift behandelt wurden, welches die Komplement-Aktivierung unterdrückt, resistent gegenüber einem experimentell erzeugtem BP sind (Liu et al., 1995). Die Komplementaktivierung kann über drei Wege erfolgen, den klassischen, den alternativen und den Lektin-Weg. Bei C5-defizienten Mäusen ließ sich kein experimentelles BP auslösen. Diese Daten deuten darauf hin, dass der klassische Weg der Komplementaktivierung eine wichtige Rolle bei der Krankheitsentstehung spielt (Liu et al., 1995). Um diese Annahme weiter zu festigen, blockierten Nelson et al. bei C4-defizienten Mäusen, die sowohl im klassischen Weg als auch im Lektin-Weg ein Defizit haben, C1b, welches die erste Komponente des klassischen Wegs bildet. Die Mäuse zeigten bei Behandlung mit pathogenem Anti-BP180 IgG keine Komplementaktivierung in der Haut und keine Blasenbildung (Nelson et al., 2006). Mäuse, denen Faktor B, ein wichtiger Bestandteil des alternativen Wegs, fehlte, zeigten einen verzögerten und mildereren Krankheitsverlauf bei Behandlung mit pathogenem Anti-BP180 IgG (Nelson et al., 2006). Die Bedeutung des

Zusammenspiels zwischen C5 und der Mastzellgranulation konnten Heimbach et al. im Jahr 2011 darstellen. Mäuse mit Mastzell- oder C5a-Mangel zeigten keine Krankheitsaktivität bei der Injektion von Anti-BP180 IgG, zudem ließ sich eine verringerte p38 MAPK-Phosphorylierung nachweisen. Bei den Mäusen mit Mastzellmangel konnte auch durch Injektion von C5a keine vermehrte p38 MAPK-Phosphorylierung nachgewiesen werden, ebenso wenig bei Ausgleich des Mastzellmangels bei C5a-defizienten Mäusen. Zusammengenommen deutet dies daraufhin, dass C5a mit C5a-Rezeptoren auf Mastzellen interagiert, so den p38-MAPK-Signalweg aktiviert und eine Mastzell-Degranulation wird (Heimbach et al., 2011).

Schulze et al. haben unter Verwendung eines Mausmodells mit adulten Mäusen ebenfalls die Bedeutung der Komplementaktivierung untersucht. Anders als bei Liu et al. waren C5-defiziente Mäuse jedoch nur zu 50% vor dem pathogenen Effekt von Anti-BP180 IgG geschützt (Liu et al., 1995; Schulze et al., 2014). Durch die Verwendung verschiedener Fc γ -Rezeptor-defizienter Mäusestämme konnten Schulze et al. zudem zeigen, dass die Gewebeerstörung durch Fc γ -Rezeptor IV und Fc γ -Rezeptor III vermittelt wird, Fc γ -Rezeptor IIB protektiv wirkt und Fc γ -RI nicht wesentlich beteiligt war (Schulze et al., 2014).

Das zweite Autoantigen ist BP230 (auch bekannt als BP Antigen 1), es gehört zu der Familie der Plakin-Proteine und ist ein 230 kDa großer intrazellulärer Bestandteil der hemidesmosomalen Plaques (Schmidt & Zillikens, 2013; Skaria et al., 2000; Goletz et al., 2017). Plakine sind in den Epithelzellen lokalisiert, sie haben Kontakt zu Intermediärfilamenten und verleihen dem Zellverband Zugfestigkeit. BP 230 besteht aus drei Domänen, einer zentralen stabförmigen und zwei endständigen globulären Domänen (Ruhrberg & Watt, 1997). Über die endständige N-Domäne, die auch Plakin-Domäne genannt wird, erhält BP230 Kontakt zu BP180 und α 6 β 4-Integrin (Abb. 2) (Sonnenberg et al., 1999; Hopkinson & Jones, 2000). Die terminale C-Domäne interagiert mit den Keratinfilamenten in Hemidesmosomen (Yancey, 1995; Yang et al., 1996). BP230 ist eine Isoform, die durch das Dystonin-Gen codiert wird (Guo et al., 1995). 1995 veröffentlichte Studien zeigten, dass Mäuse, die einen Defekt im Dystonin-Gen haben, Blasen an der Haut sowie neurodegenerative Veränderungen entwickelten (Guo et al., 1995).

Pas et al. konnten bereits 1995 nachweisen, dass die Reaktivität der IIF sowohl auf Affenösophagus als auch auf humaner Spalthaut vornehmlich durch die gegen BP230 gerichteten Antikörper vermittelt wird (Pas et al., 1995). Zudem stellten Hamada et al. 2001 fest, dass 90% der von ihnen getesteten Seren im Immunoblot IgG Reaktivität gegen BP230 zeigten. 80 % der Seren wiesen IgG-Antikörper gegen den C-terminalen Bereich von BP230 auf, 38 % gegen die N-terminale Domäne und 40 % gegen die zentrale Domäne (Hamada et al., 2001). Auch Blöcker et al. konnten bestätigen, dass die C-terminale Domäne vom BP230 die immundominate Region zu sein scheint (Blöcker et al., 2012). Zudem konnten sie präziser sagen, dass die meisten Seren (65%) IgG-Autoantikörper gegen das Fragment C3 (Abb. 9) von BP230 aufwiesen, in 55 % der getesteten Seren ließen sich Autoantikörper gegen das Fragment-C2 nachweisen. Allerdings wiesen alle Seren, die IgG-Reaktivität gegen Fragment C2 aufwiesen auch IgG-Reaktivität gegen C3 auf (Blöcker et al., 2012). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse entwickelten sie einen ELISA, der die IgG-Reaktivität gegen Fragment C3 des BP230 nachweist und auch kommerziell verfügbar ist (Blöcker et al., 2012).

Feldrihan et al. konnten 2014 in einem Mausmodell keinen pathophysiologischen Effekt von Antikörpern gegen BP230 erkennen (Feldrihan et al., 2014). Hierbei generierten sie Kaninchen Antikörper gegen die C-terminale Region von BP230, ex vivo zeigten sie, dass diese Antikörper an der Basalmembran binden und das Komplementsystem aktivieren. Die gereinigten Antikörper wurden neonatalen und adulten Mäusen injiziert, es zeigte sich zwar eine Bindung der Antikörper in der Haut der Mäuse, aber keine Komplementaktivierung (Feldrihan et al., 2014). Im Jahr 2018 konnten Haeberle et al zeigen, dass die Injektion von monoklonalem BP230-spezifischem IgG in neugeborene Mäuse zu makroskopischer und mikroskopischer Blasenbildung führt, was auf ihre pathogene Bedeutung hindeutet, ähnliche Ergebnisse erzielten auch Makita et al im Jahr 2021 (Haeberle et al., 2018; Makita et al., 2021).

Während der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von IgG Antikörpern und der Krankheitsaktivität gut beschrieben ist, konnte die Rolle der IgE-Autoantikörper bei der Entstehung des BP bisher nicht gänzlich aufgeklärt werden. Klar ist jedoch, dass bei passiven Transfermodellen, die ausschließlich IgG-Autoantikörper verwendeten, das Vollbild des BP nicht generiert werden konnte, es fehlte die

Infiltration der Haut durch Eosinophile, die ein charakteristisches Zeichen des BP darstellt (Liu et al., 1993; Nishie et al., 2007; Ujiie et al., 2010). Bereits im Jahr 1974 fanden Provost et al. bei vier von 16 BP Patienten in der DIF IgE Ablagerungen entlang der Basalmembranzzone und vermuteten, dass diese IgE Autoantikörper pathophysiologische Relevanz haben könnten (Provost & Tomasi, 1974). In Ergänzung dazu konnten Kamata et al. erst kürzlich nachweisen, dass BP Patienten, die IgE Ablagerungen in der epidermalen Basalmembran aufwiesen, eine höhere Krankheitsaktivität zeigten und einen längeren Therapiezeitraum bis zur Remission bedurften (Kamata et al., 2019). Im Jahr 2021 fanden Shih et al. heraus, dass BP Patienten, bei denen sich Anti-BP230 IgE Antikörper im Serum nachweisen ließen weniger gut auf topische Steroide ansprachen (Shih et al., 2021). Zudem zeigen verschiedene Studien, dass ca. zwei Drittel der BP Patienten erhöhte Gesamt-IgE-Spiegel im Serum aufweisen (Saniklidou et al., 2018; van Beek et al., 2016). Es ließ sich zudem eine Korrelation zwischen den Gesamt-IgE-Titern und den Spiegeln der Antikörper, die gegen die DEJ gerichtet sind, nachweisen (van Beek et al., 2016; Permin & Wiik, 1978). Auch eine Korrelation zwischen der Höhe des Gesamt-IgE Spiegels und der Krankheitsaktivität wurde bereits beschrieben (Saniklidou et al., 2018; van Beek et al., 2017b). In einer Studie von Messingham et al. ließen sich in 77% der Seren von BP Patienten IgE Antikörper gegen BP180 NC16A nachweisen, ein ähnlich hoher Anteil wie bei den IgG Autoantikörpern gegen ebendiese Domäne (Messingham et al., 2009).

Fairley et al. konnten zudem mit einem Mausmodell zeigen, dass die Injektion von BP180 IgE-Autoantikörpern in menschliche Hauttransplantate zu Läsionen führte, die der frühen Phase des BP ähnelten, einschließlich der Degranulation von Mastzellen, des eosinophilen Zustroms und der spontanen Blasenbildung (Fairley et al., 2007). In einem ähnlichen Modell wurden Mäusen, denen T- und B-Lymphozyten fehlten menschliche Haut auf den Rücken transplantiert. Anschließend wurden Anti-BP180-IgE-produzierenden Hybridomzellen unter die Transplantate injiziert. In einem Beobachtungszeitraum von 21 Tagen zeigten sich hier makroskopisch Erytheme, aber keine Blasenbildung. Histologisch ließ sich eine subepidermale Spaltbildung nachweisen (Zone et al., 2007).

Sowohl Hurskainen et al. als auch Zhang et al. generierten einen Mausstamm, der ein dysfunktionales BP180 besaß, die Mäuse entwickelten neben einer Entzündung

der Haut erhöhte IgE-Spiegel im Blut, was auf eine wichtige pathophysiologische Rolle der IgE Antikörper in der Entstehung des BP schließen lässt (Zhang et al., 2018; Hurskainen et al., 2015).

2015 kamen Bing et al. durch die Untersuchung von 37 BP Patienten zu dem Schluss, dass die Konzentration der Anti-BP180 NC16A IgE Autoantikörper im frühen Stadium der Erkrankung weder im Blut noch in der Blasenflüssigkeit mit der Krankheitsaktivität korreliert (Bing et al., 2015).

Van Beek et al. konnten zeigen, dass die IgE-Antikörper gegen die NC16A Domäne des BP180 intraindividuell mit der anhand des BPDAl ermittelten Krankheitsaktivität korrelieren (van Beek et al., 2017b). Iwata et al. beschrieben zudem, dass das Auftreten von IgE-Antikörpern gegen BP180 mit einer schwereren Form des BP, einer intensiveren und längeren Therapie bis zum Erreichen der Remission vergesellschaftet ist (Iwata et al., 2008). Ein weiteres Indiz für die pathophysiologische Bedeutung der IgE Antikörper in der Pathogenese des BP ist der erfolgreiche Einsatz von Omalizumab, einem humanisierten anti-IgE-Antikörper (Yu et al., 2014; London et al., 2012).

Messingham et al. stellten im Jahr 2014 fest, dass die Zahl der Eosinophilen im Blut sowohl mit dem Gesamt-IgE als auch mit dem Anti-BP180 IgE korreliert. Zudem konnten sie nachweisen, dass die Eosinophilen von BP Patienten den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI exprimierten (Messingham et al., 2014).

Mittels Mausmodell zeigten Lin et al., dass Eosinophile für die IgE-vermittelte Blasenbildung beim BP notwendig sind. Sie verabreichten adulten Mäusen Anti-BP180 IgE Antikörper, welche daraufhin Blasen entwickelten. Die Schwere der Blasenbildung hing dabei von der Menge des injizierten Anti-BP180 IgE ab. Mäuse mit einem Mangel an Eosinophilen bildeten jedoch nach derselben Injektion keine Blasen (Lin et al., 2018).

Der Nachweis von Anti-BP230 IgE Antikörpern im Serum wurde bei 38-68% der BP Patienten beschrieben, eine Relevanz für die Entstehung der Erkrankung konnte in Tiermodellen bisher nicht nachgewiesen werden, auch eine Korrelation zwischen der Höhe der Antikörper-Titer und der Krankheitsaktivität ließ sich bisher nicht bestätigen (Lee et al., 2012; Feldrihan et al., 2014; Ishiura et al., 2008; Hashimoto

et al., 2017). Im Jahr 2008 stellten Ishiura et al. allerdings fest, dass das Vorkommen von BP230 IgE Antikörpern mit einer erhöhten lokalen Eosinophilie vergesellschaftet ist (Ishiura et al., 2008). Und erst kürzlich konnten Shih et al. belegen, dass BP Patienten mit nachgewiesenen Anti-BP230 IgE Antikörpern schlechter auf topische Steroide ansprechen (Shih et al., 2021).

1.4 Diagnostik

Die Diagnose des BP wird anhand mehrerer Kriterien gestellt; zu diesen gehören klinische, histologische und immunpathologische Merkmale (Schmidt & Zillikens, 2013; Schmidt et al., 2020). Bei der Anamnese-Erhebung sind unter anderem der Juckreiz, der Zeitpunkt des Auftretens der Haut- und evtl. auch Schleimhautläsionen, die (v.a. neurologischen) Vorerkrankungen und die Medikamentenanamnese (Diuretika, DPP4I) von Bedeutung. Die körperliche Untersuchung sollte neben der allgemeinen Inspektion der Haut auch eine Inspektion der Konjunktiven, der Mundhöhle, der Nasenlöcher, sowie der Genital- und Analregion beinhalten (Schmidt et al., 2020). Auch die Prüfung des Nikolski-

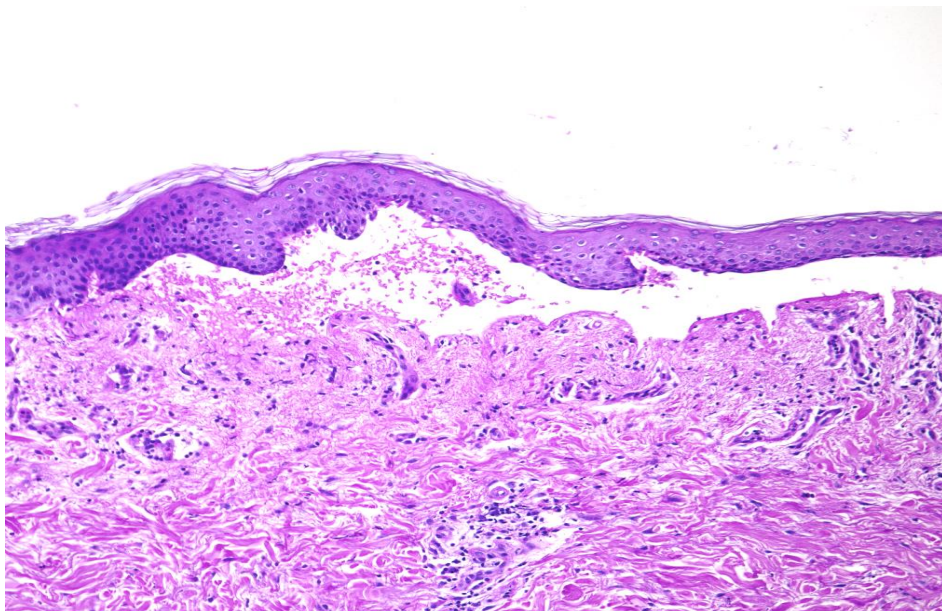


Abb. 3 Histologie einer läsionalen Hautbiopsie eines BP Patienten.

Es lässt sich eine subepidermale Spaltbildung erkennen. Im Spaltlumen sowie in der oberen Dermis finden sich eosinophile und neutrophile Granulozyten. HE-Färbung, 100facher Vergrößerung.

Zeichen, bei dem durch Schiebedruck auf gesund erscheinender Haut bei Erkrankungen mit intraepidermaler Spaltbildung eine Erosion erzeugt werden kann, kann durchgeführt werden (Schmidt et al., 2020). Das Nikolski-Zeichen ist bei BP Erkrankungen stets negativ. Um die Krankheitsaktivität initial und im Therapieverlauf zu beurteilen, sollte in regelmäßigen Abständen der BPDAI (Bullous Pemphigoid Disease Area Index) (Abb. 8) erhoben werden, welcher möglichst jedes Mal durch denselben Untersucher durchgeführt wird (Schmidt et al., 2020).

Bei der histologischen Untersuchung einer läsionalen Hautbiopsie, lässt sich neben der subepidermalen Blasenbildung auch ein lymphozytenreiches, eosinophiles Infiltrat nachweisen (siehe Abb. 3), die Histologie spielt bei der Diagnosefindung jedoch eine eher untergeordnete Rolle (Schmidt & Zillikens, 2011b; Kippes et al., 1999; Schmidt et al., 2020).

Die DIF (Abb. 4) gilt aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität als Goldstandard zum Nachweis einer bullösen Autoimmundermatose; mit ihr lassen sich gewebegebundene Antikörper nachweisen (Chiorean et al., 2014; Schmidt & Zillikens, 2010; Vodegel et al., 2004; van Beek et al., 2012; van Beek et al., 2018). Die ideale Biopsiestelle ist periläsional und liegt ca 1 cm von einer bestehenden Blase entfernt (Kippes et al., 1999). Beim BP lassen sich in der DIF lineare IgG und/oder

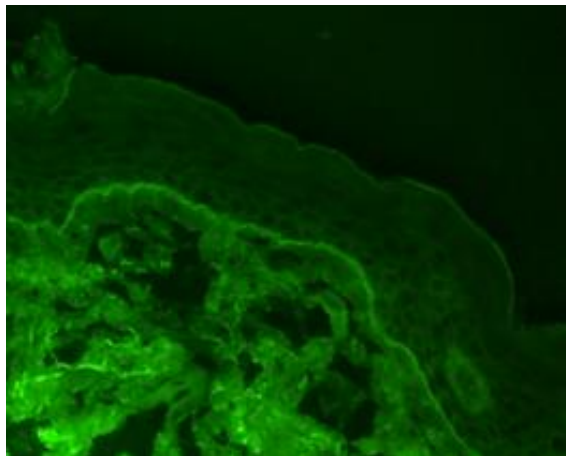


Abb. 4 Direkte Immunfluoreszenz (DIF) einer periläsionalen Hautbiopsie bei einem BP Patienten in 100facher Vergrößerung.

Lineare Antikörperablagerungen entlang der Basalmembran bei Beschichtung mit Anti-humanem IgG

C3, seltener auch lineare IgE und IgA Ablagerungen an der DEJ nachweisen (Schmidt & Zillikens, 2013; Witte et al., 2018; Schmidt et al., 2020).

Eine Methode, um zirkulierende Antikörper im Serum der Patienten nachzuweisen, ist die IIF, diese kann an gesunder durch Natriumchloridlösung aufgespaltener humaner Haut (siehe Abb. 5), an Affen- oder Kaninchenösophagus (siehe Abb. 6) durchgeführt werden (Schmidt et al., 2020). Die für die Pemphigoiderkrankungen sensitivste indirekte Immunfluoreszenz-Methode erfolgt an gesunder Haut, bei der

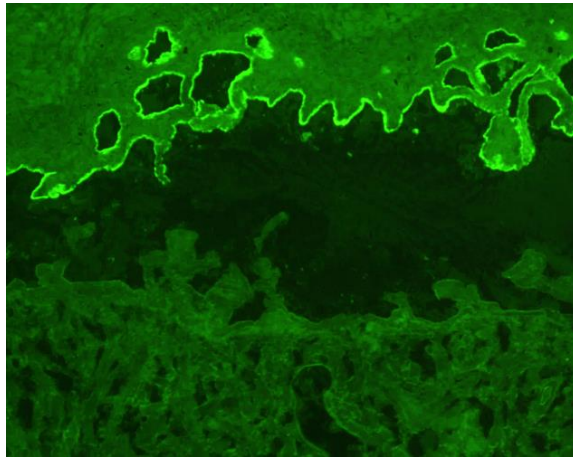


Abb. 5 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF) auf humaner Spalthaut in 100facher Vergrößerung.

Die IIF zeigt lineare Ablagerungen von IgG-Antikörpern am Dach der artifiziiellen Blase bei Inkubation mit Serum von einem BP Patienten.

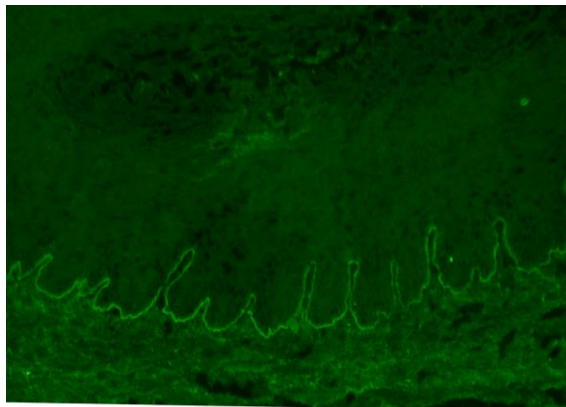


Abb. 6 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF) auf Affenösophagus in 100facher Vergrößerung.

Die IIF zeigt lineare Antikörper-Ablagerungen entlang der Basalmembran nach Inkubation mit Serum von einem BP Patienten

durch Natriumchloridlösung eine Spaltbildung in der Lamina lucida der Basalmembran induziert wurde; hier lassen sich IgG Antikörper im Dach der Blase nachweisen (Schmidt & Zillikens, 2013; Otten et al., 2014; Schmidt et al., 2020). Eine IIF ist bei allem Patienten mit fraglichem BP empfehlenswert; sie erlaubt auch Antikörper gegen andere Strukturen der DEJ zu detektieren (Schmidt et al., 2020). Seit einiger Zeit gibt es multivariante Methoden, hierzu gehört die der BIOCHIP®, einem IIF-basierten Verfahren, bei diesem können in einem Inkubationsschritt Antikörper gegen verschiedene Substrate gleichzeitig nachgewiesen und dadurch mit geringerem Zeit- und Materialaufwand zwischen dem BP und anderen bullösen Autoimmunerkrankungen unterschieden werden (van Beek et al., 2017a). Die Inkubationsfelder sind mit verschiedenen Substraten beschichtet, hierzu zählen die immundominante Domänen von BP180, BP230, Desmoglein 1, Desmoglein 3, Affenösophagus und durch Salzlösung aufgespaltene gesunde Primatenhaut (van Beek et al., 2017a; Witte et al., 2018).

Um spezifische zirkulierende Antikörper nachzuweisen, können kommerzielle ELISA für Antikörper gegen BP230 und BP180 NC16A verwendet werden. Ein großer Vorteil der ELISA ist, dass die Antikörper nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ bestimmt werden können. So ist beispielsweise eine Aussage darüber möglich, ob die Antikörper-Spiegel mit der Krankheitsaktivität korrelieren (Witte et al., 2018; Schmidt & Zillikens, 2010; van Beek et al., 2012; Otten et al., 2014; Roussel et al., 2011). Seit Kurzem gibt es ELISA-Systeme, bei denen in einem Schritt und mit einer Serumprobe Autoantikörper gegen sechs verschiedene Zielantigene (Desmoglein 1, Desmoglein 3, Envoplakin, BP180, BP230 und Typ VII Kollagen) nachgewiesen werden können, so kann mit geringem Zeit- und Materialaufwand zwischen den unterschiedlichen bullösen Autoimmundermatosen unterschieden werden (van Beek et al., 2017a).

Sollte bei Patienten ein dringender klinischer Verdacht auf ein BP bestehen, die bisher aufgeführten Untersuchungsmethoden jedoch keine eindeutigen Ergebnisse liefern, können zusätzlich Immunoblots zum Einsatz kommen. Es lassen sich so Antikörper gegen verschiedene andere Bestandteile der DEJ nachweisen, hierzu zählen Laminin-332 (beim SHP), Laminin γ 1/p-200 (beim Anti-p-200-Pemphigoid) und lineare IgA Dermatoase Antigen-1 (LAD-1, beim BP oder SHP) (Sitaru et al., 2004).

1.4. Therapie

Derzeit gibt es keine allgemein anerkannte Einteilung des BP in verschiedene Krankheitsstadien, in der aktuellen Leitlinie wird jedoch bei einer betroffenen Körperfläche von unter 10% von einem milden Verlauf, zwischen 10 und 30% von einem mittelschweren und über 30% betroffener Körperoberfläche von einem schweren Verlauf gesprochen (Messingham et al., 2019; Schmidt et al., 2020). Neben der betroffenen Körperoberfläche erlaubt auch der bereits oben erwähnte BPDAl eine Aussage über die Krankheitsaktivität, Masmoudi et al. empfehlen eine Einteilung in eine milde Krankheitsaktivität bei weniger als 20 Punkten im BPDAl, einen moderaten Krankheitsaktivität zwischen 20 und 56 Punkten und ab einer Punktzahl von 57 Punkten sollte von einer hohen Krankheitsaktivität gesprochen werden. Diese Grenzwerte entwickelten sie anhand einer Kohorte von 285 BP Patienten aus 50 dermatologischen Abteilungen auf der Grundlage der 25. und 75. Perzentile des BPDAl-Scores (Masmoudi et al., 2021).

Beim milden Verlauf ist häufig eine topische Therapie mit Clobetasolpropionat ausreichend, diese hat im Vergleich zur systemischen Therapie mit Glukokortikoiden erheblich weniger Nebenwirkungen und wird allein durch die schlechte Praktikabilität bei verschiedenen Patientengruppen eingeschränkt (Schmidt & Zillikens, 2013; Joly et al., 2009; Schmidt et al., 2020). So ist es vor allem für ältere oder für weitgehend immobile Patienten schwierig zweimal täglich eine großflächige topische Therapie durchzuführen (Miyamoto et al., 2019). Bei großen Blasen wird eine sterile Punktion unter Belassung des Blasendaches durchgeführt (Schmidt et al., 2020). Zur lokalen Antisepsis kann beispielsweise Octenidin verwendet werden (Schmidt et al., 2020).

Bei ausgeprägten Verläufen kommen systemische Glukokortikoide und/oder Immunmodulatoren zu Einsatz (Schmidt & Zillikens, 2013, 2011b; Schmidt et al., 2020). Als Induktionsdosis systemischer Glukokortikosteroide reichen in der Regel 0,5 Milligramm (mg) Prednisolon pro Kilogramm (kg) Körpergewicht (KG) pro Tag (d) aus, ggf. auch weniger (Schmidt & Zillikens, 2013; Schmidt et al., 2020). Bei Erreichen einer Remission ist es ratsam, die Glukokortikoiddosis schrittweise zu reduzieren und wenn möglich im Verlauf gänzlich abzusetzen (Schmidt et al., 2020). Um Glukokortikoide einzusparen können Immunmodulatoren eingesetzt werden

z.B. Dapson 1,5 mg/ kg KG/ d, alternativ Doxycyclin 200mg/d, Azathioprin 2-2,5 mg/ kg KG/ d, Methotrexat 20 mg/ Woche oder Mycophenolat mofetil 2 g/d (Schmidt & Zillikens, 2011a; Miyamoto et al., 2019; Schmidt et al., 2020). Sollte trotz dieser Therapie keine Remission erreicht werden, können hochdosierte intravenöse Immunglobuline (IVIg) im Abstand von 4-6 Wochen verabreicht werden, weitere Möglichkeiten bestehen in der Plasmapherese oder in der Therapie mit dem anti-CD20 Antikörper Rituximab (Amagai et al., 2017; Schmidt & Zillikens, 2011a; Fairley et al., 2009; Schmidt et al., 2020).

Vor dem Einsatz von systemischen Therapien müssen einige Punkte beachtet werden, zunächst sollten Leber- und Nierenfunktionsstörungen ausgeschlossen werden (Schmidt et al., 2020). Bei klinischen, anamnestischen oder laborchemischen Verdacht auf eine Infektion mit dem humanen Immundefizienz Virus (HIV) oder andere chronische Infektionen, z.B. Hepatitis B sollten diese zunächst abgeklärt werden (Schmidt et al., 2020). Die Patienten sollten über den notwendigen konsequenten Schutz vor ultravioletten (UV) Strahlen informiert werden, zusätzlich sind regelmäßige Inspektionen der Haut bei einem erhöhten Risiko für kutane Neoplasien zu empfehlen (Schmidt et al., 2020). Zudem sind regelmäßige Laborkontrollen u.a. mit Blutbild und Bestimmung der Nieren- und Leberwerte notwendig (Schmidt et al., 2020).

Bei einzelnen Immunmodulatoren sind spezielle Maßnahmen vor der Therapie einzuleiten. Da Azathioprin über die Thiopurinmethyltransferase (TPMT) abgebaut wird, für die ein genetischer Polymorphismus besteht, ist es ratsam deren Aktivität im Vorfeld der Therapie zu bestimmen, um die notwendige Dosis zu bestimmen und eine Überdosierung zu vermeiden (Schmidt et al., 2020). Bei Dapson ist die Enzymaktivität der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase zu bestimmen, da Patienten mit einer verminderten Aktivität dieses Enzyms ein erhöhtes Risiko für eine fulminant verlaufende Dapson-induzierte Hämolyse haben (Belfield & Tichy, 2018; Schmidt et al., 2020).

Bisher nur als Dritt-Linien Therapie wird Rituximab eingesetzt, ein monoklonaler humaner IgG1-Antikörper, der gezielt an CD20, einem von B-Lymphozyten exprimierten transmembranen Rezeptor bindet (Amber et al., 2018). Über verschiedene Mechanismen werden durch Rituximab die B-Lymphozyten

unterdrückt, sowohl die Antikörper- als auch die Komplement-abhängige Zytotoxizität wird vermindert und die Apoptose wird gefördert (Kasperkiewicz et al., 2011).

2. Fragestellung

Die Zielantigene des BP sind BP180 und BP230. Die IgG-Autoantikörper bilden hier die Hauptfraktion, jedoch wurden auch IgE Autoantikörper nachgewiesen. So beschrieben Dimson et al, dass bei 90% der BP Patienten IgE Autoantikörper gegen BP180 vorkommen, Messingham et al konnten bei 77 % der BP Patienten IgE Antikörper gegen BP180 nachweisen, van Beek et al bei 40% (Jordon et al., 1967; Messingham et al., 2009; Fairley et al., 2009; Dimson et al., 2003; van Beek et al., 2016; van Beek et al., 2017b). Auch die berichteten Häufigkeiten von Anti BP230 – IgG und IgE Autoantikörpern sind sehr variabel (Ghohestani et al., 1998; Fania et al., 2012; Ishiura et al., 2008). Einige Studien berichten für Anti-BP230 IgE eine höhere Frequenz als für Anti-BP180 IgE sowie eine Assoziation zu unterschiedlichen klinischen Phänotypen (Hashimoto et al., 2017; Ishiura et al., 2008; Engineer et al., 2001, 2001). Die Anti-BP230 IgE Autoantikörper wurden allerdings in bisherigen Studien im Vergleich zu den Anti-BP180 IgE Antikörpern seltener untersucht und ihre Bedeutung ist nicht ausreichend geklärt (Messingham et al., 2009; Fairley et al., 2007; van Beek et al., 2017b; Iwata et al., 2008).

Ziel dieser Studie ist es, die folgenden Fragestellungen zu beantworten:

- Korrelieren Anti-BP230 IgE Autoantikörpern mit der allgemeinen oder der intraindividuellen Krankheitsaktivität?
- Kann ein Zusammenhang zwischen den Anti-BP230 IgE Antikörpern und dem klinischen Phänotyp des BP hergestellt werden?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von IgE-Autoantikörpern gegen BP230 und einer vermehrten Eosinophilie im Blut der BP Patienten?
- Bietet der Test einen zusätzlichen diagnostischen Nutzen?
- Können IgE Autoantikörper gegen BP230 auch bei Patienten mit anderen bullösen Autoimmundermatosen oder bei gesunden Blutspendern nachgewiesen werden?
- Lassen sich bei Patienten mit BP auch IgE Antikörper gegen andere Epitope des BP230 als der im ELISA verwendeten C-globulären Domäne nachweisen?

3. Material und Methoden

3.1. Vorarbeit

Der für diese Arbeit angewendete Anti-BP230 IgE ELISA wurde von Annabelle von Georg bereits am LIED etabliert. Hierfür wurde das Anti-BP230 IgG ELISA-Kit mit einem IgE-Konjugat (beide Euroimmun Lübeck) verwendet. Zur Auswertung wurde die optische Dichte (OD) mit dem ELISA Reader (GloMax) bei 450 nm Messwellenlänge gemessen und anschließend die OD des Leerwertes (Sample buffer) subtrahiert, der resultierende Wert wird im Folgenden OD-b genannt. Im ersten Schritt wurde der ELISA mit 12 Seren von BP Patienten mit hohen BP230 IgG Titern und niedrigen Anti-BP180 NC16A IgG Titern und bei 10 Seren von Kontrollpatienten mit einem Alter über 75 Jahren durchgeführt. Hierbei wurde das Patientenserum jeweils unverdünnt eingesetzt. Dieser Schritt diente dazu herauszufinden, ob sich mit dem neuen ELISA Anti-BP230 IgE Antikörper nachweisen lassen. Dabei zeigten sich bei drei Seren der BP Patienten hohe OD-b-Werte (1,51 OD-b, 0,78 OD-b und 0,65 OD-b) und bei drei Seren mittelhohe OD-b-Werte (0,09 OD-b, 0,09 OD-b und 0,08 OD-b). Bei den restlichen Seren lagen die OD-b-Werte niedriger ($<0,06$ OD-b). Im zweiten Schritt sollte ermittelt werden, mit welcher Verdünnung der Seren die Anti-BP230 IgE Antikörperspiegel am besten dargestellt werden. Hierzu wurde der ELISA in unterschiedlichen Verdünnungen der Seren und des Konjugats durchgeführt. Hierfür wurden die zuvor untersuchten Seren mit hohen und mittleren Anti-BP230 IgE Spiegel, drei Seren von gesunden Probanden mit hohem Gesamt-IgE Spiegel (>500 u/l) und drei Seren von gesunden Probanden mit niedrigen Gesamt-IgE Spiegel (<100 u/l) verwendet. Der zu etablierende ELISA wurde mit unverdünntem Konjugat mit 1:10 verdünnten und mit 1:100 verdünnten Seren durchgeführt. Zudem wurde der ELISA mit 1:10 verdünnten Konjugat und unverdünnten Seren durchgeführt. Optimale Detektion von Anti-BP230 IgE wurden bei Inkubation mit unverdünnten Seren und unverdünnten Konjugat erzielt. Aufgrund des Einflusses des proportionalen Anteils an spezifischem IgE zu Gesamt IgE wie bereits beschrieben (van Beek et al., 2017b) wurde die ROC (Receiver Operating Characteristic) Analyse mit drei unterschiedlichen Grenzwerten in Abhängigkeit vom Gesamt-IgE-Spiegel und optimiert auf eine hohe Spezifität festgelegt (siehe Tab. 2). Für die ROC-Analyse

wurden Seren von 34 BP Patienten (Kohorte 1) und 105 Seren von Kontrollpatienten über 75 Jahren verwendet. Das Alter der BP Patienten lag zwischen 54 und 95, wobei der Mittelwert bei 80,5 Jahren lag, davon waren 22 (64,7 %) Frauen und 12 (35,3%) Männer (siehe Tab. 2 und Abb. 7). Da es sich bei den Seren überwiegend um externe Einsendungen handelt, lagen uns bei 17 Patienten die Ergebnisse einer direkten Immunfluoreszenz nicht vor.

Tab. 2: Übersicht der BP Patienten, die für die ROC Analyse verwendet wurden (Kohorte 1).

Patient	Alter	Geschlecht	DIF	IIF Spalthaut	IIF Affenösoophagus	Anti-BP180 NC16A IgG ELISA
BP-1-1	92	W	IgG, C3	IgG	IgG	negativ
BP-1-1	85	W	n.e.	IgG	IgG	83
BP-1-2	86	W	IgG	IgG	IgG	negativ
BP-1-3	74	W	IgG	negativ	negativ	24
BP-1-4	87	W	n.e.	IgG	n.e.	27
BP-1-5	89	W	n.e.	IgG	IgG	46
BP-1-6	82	M	n.e.	negativ	negativ	36
BP-1-7	88	M	n.e.	IgG	n.e.	31
BP-1-8	75	M	IgG, C3	IgG	n.e.	negativ
BP-1-9	88	W	n.e.	IgG	IgG	109
BP-1-10	76	W	n.e.	IgG	IgG	54
BP-1-11	54	M	n.e.	IgG	IgG	145
BP-1-12	88	W	n.e.	IgG	IgG	negativ
BP-1-13	61	W	n.e.	IgG	IgG	126
BP-1-14	80	M	IgG	IgG	IgG	38
BP-1-15	89	W	IgG, C3	IgG	IgG	67
BP-1-16	81	W	n.e.	IgG	IgG	31
BP-1-17	73	W	n.e.	IgG	n.e.	65
BP-1-18	82	M	n.e.	IgG	IgG	56
BP-1-19	68	W	n.e.	negativ	negativ	21
BP-1-20	67	W	C3	IgG	IgG	negativ
BP-1-21	85	W	n.e.	IgG	IgG	117
BP-1-22	79	M	IgG, C3	IgG	IgG	69
BP-1-23	81	W	n.e.	IgG	IgG	26
BP-1-24	76	M	C3	IgG	IgG	118
BP-1-25	83	W	IgG	IgG	IgG	83
BP-1-26	75	M	IgG, C3	IgG	IgG	negativ
BP-1-27	74	M	n.e.	IgG	IgG	134
BP-1-28	95	M	IgG, C3	IgG	IgG	324
BP-1-29	88	M	IgG, C3	IgG	IgG	175
BP-1-30	86	W	negativ	IgG	IgG	94
BP-1-31	86	W	n.e.	n.e.	n.e.	37
BP-1-32	84	M	negativ	IgG	n.e.	35
BP-1-33	84	M	n.e.	IgG	IgG	316

BP-1-34	75	W	n.e.	IgG	IgG	74
Summe der positiven			13	30	26	28

DIF= direkte Immunfluoreszenz, IIF= indirekte Immunfluoreszenz, W= weiblich, M= männlich, n.e.= nicht erfolgt, IgG= Immunglobulin G, C3=Komplement 3.

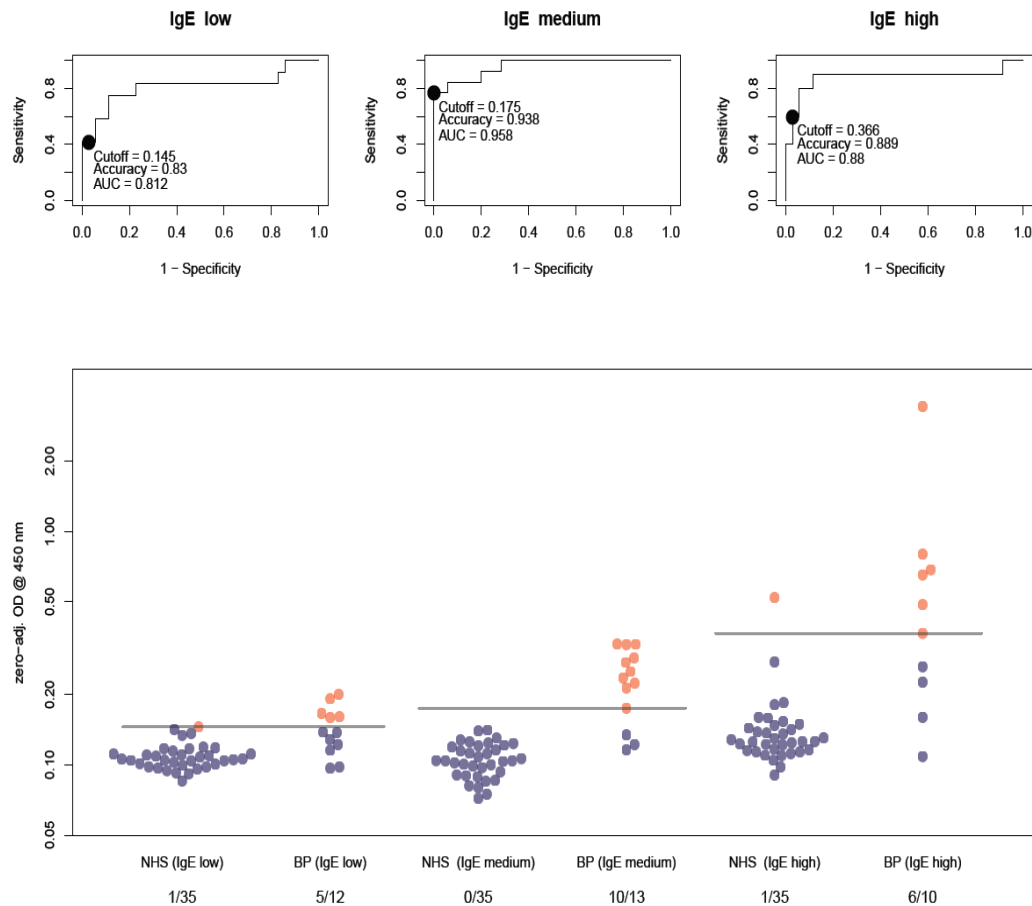


Abb. 7 Grafische Darstellung der Ergebnisse der ROC-Analyse. Der Anti-BP230 IgE ELISA wurde mit Seren von 34 BP Patienten und 105 NHS durchgeführt. Die NHS Seren wurden anhand des Gesamt-IgE -Werte ausgewählt: 35 mit niedrigen Gesamt-IgE (<100 U/ml), 35 mit mittleren Gesamt-IgE (100-500 U/ml) und 35 mit hohem Gesamt-IgE (>500 U/ml). Die Grenzwerte (waagerechte Linien) wurden anhand von Spezifität und Sensitivität ermittelt. Alle violetten Punkte stellen negative Seren dar, alle orangenen positive.

3.2. Patienten und Kontrollen

Für weiterführende Untersuchungen waren bereits 74 Seren von Patienten mit gesichertem BP zum Zeitpunkt der Erstdiagnose vorhanden (Kohorte 2), die Diagnose wurde mittels DIF und serologischen Ergebnissen gesichert (siehe Tab. 3). Die Seren wurden am Universitätsklinikum Lübeck in der Klinik für Dermatologie in den Jahren 2014 bis 2018 gesammelt. Das Alter der Patienten lag zwischen 50 und 93 Jahren, mit einem mittleren Alter von 79,5 Jahren. Der Frauenanteil lag bei 51,4 % (Tab. 3). Bei den Patienten wurde zum Zeitpunkt der Erstvorstellung und möglichst bei jeder Wiedervorstellung der BPDAI erhoben. Zudem wurden die Patienten mittels eines standardisierten Datenbogen erfasst, was für eine bessere Vergleichbarkeit der Patienten untereinander sorgt. In diesem Datenbogen wurde neben der Eigenanamnese, dem BPDAI und den diagnostischen Ergebnissen (DIF, IIF, ELISA, Histologie) auch die Familienanamnese erhoben. Für die vorliegende Promotionsarbeit waren keine zusätzlichen Patientenkontakte notwendig. Die Seren wurden von der Abnahme bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Neben dem Anti-BP230 IgE und dem Gesamt-IgE ELISA wurden bei diesen Seren auch der Anti-BP230 IgG ELISA, der Anti-BP180 IgG und IgE ELISA durchgeführt. Von 7 Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Anti-BP230 IgE Antikörper nachweisbar waren, wurden zusätzlich Seren untersucht, die zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf abgenommen wurden. Hierdurch sollte überprüft werden, inwieweit die Höhe der Anti-BP230 IgE Antikörper intraindividuell mit der Krankheitsaktivität korreliert.

Tab. 3 Darstellung der BP Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (Kohorte 2).

Patient	Alter	Geschlecht	DIF	IIF Spalt-haut	IIF Affen-ösophagus	Anti-BP180 NC16A IgG ELISA
BP-2-1	88	M	IgG, C3	IgG	IgG	46
BP-2-2	83	M	IgG, C3	IgG	IgG	negativ
BP-2-3	88	W	IgG, C3	IgG	IgG	162
BP-2-4	77	M	IgG, IgA	IgG	IgG	negativ
BP-2-5	72	M	IgG, C4	IgG	n.e.	187
BP-2-6	90	W	IgG, C3	IgG	IgG	2.711
BP-2-7	82	M	IgG	IgG	IgG	30
BP-2-8	83	W	C3	IgG	IgG	36

BP-2-9	64	W	IgG, C3	IgG	IgG	negativ
BP-2-10	71	M	IgG, C3	IgG	IgG	597
BP-2-11	87	M	IgG, IgA	IgG	IgG	165
BP-2-12	78	M	IgG	IgG	IgG	148
BP-2-13	74	M	IgG, C3	IgG	IgG	177
BP-2-14	85	W	IgG, C3	IgG	IgG	114
BP-2-15	72	M	IgG, C3	negativ	negativ	negativ
BP-2-16	82	M	IgG, C3	IgG	IgG	26
BP-2-17	86	M	IgG, C3	IgG	IgG	180
BP-2-18	93	W	IgG	n.e.	n.e.	190
BP-2-19	78	M	IgG, C3	negativ	IgG	145
BP-2-20	80	M	IgG, C3	IgG	IgG	332
BP-2-21	78	M	IgG	IgG	IgG	186
BP-2-22	74	M	IgG, C3	IgG	IgG	149
BP-2-23	86	W	IgG	IgG	IgG	48
BP-2-24	87	M	IgG, C3	IgG	IgG	142
BP-2-25	85	W	IgG	IgG	IgG	522
BP-2-26	67	W	C3	IgG	IgG	27
BP-2-27	75	M	IgG	IgG	n.e.	725
BP-2-28	85	M	IgG, C3	IgG	IgG	520
BP-2-29	72	W	negativ	negativ	negativ	negativ
BP-2-30	78	M	IgG	IgG	IgG	negativ
BP-2-31	81	W	IgG, IgA, C3	IgG	IgG	159
BP-2-32	83	W	IgG, C3	IgG	IgG	negativ
BP-2-33	74	W	IgG, C3	IgG	IgG	184
BP-2-34	72	M	IgG, C3	IgG	IgG	1.449
BP-2-35	81	M	IgG, C3	IgG	IgG	326
BP-2-36	63	W	IgG, C3	IgG	IgG	33
BP-2-37	86	W	C3	IgG	negativ	341
BP-2-38	83	M	IgG, C3	IgG	negativ	151
BP-2-39	73	M	IgG, C3	negativ	negativ	122
BP-2-40	98	W	IgG	negativ	IgG	148
BP-2-41	92	W	C3	IgG	IgG	806
BP-2-42	93	W	C3	IgG	IgG	230
BP-2-43	87	W	IgG, C3	IgG	IgG	1.870
BP-2-44	69	W	IgG	IgG	IgG	negativ
BP-2-45	81	M	IgG, C3	IgG	negativ	150
BP-2-46	88	W	IgG, C3	IgG	IgG	86
BP-2-47	88	M	IgG, C3	IgG	IgG	106
BP-2-48	80	W	IgG, C3	IgG	IgG	156
BP-2-49	84	W	C3	IgG	IgG	negativ
BP-2-50	69	M	IgG, C3	IgG	IgG	936
BP-2-51	50	W	IgG, IgA	IgG, IgA	IgG	68
BP-2-52	86	W	IgG, C3	IgG	IgG	251
BP-2-53	61	W	C3	negativ	negativ	negativ
BP-2-54	93	W	C3	IgG	IgG	225
BP-2-55	84	W	IgG, C3	IgG	IgG	169
BP-2-56	86	W	IgG, C3	IgG	IgG	330
BP-2-57	79	M	IgG	IgG	IgG	433
BP-2-58	66	M	IgG, C3	IgG	negativ	98
BP-2-59	82	W	IgG, C3	IgG	IgG	68
BP-2-60	77	M	IgG, C3	IgG	IgG	negativ

BP-2-61	75	W	IgG	IgG	IgG	34
BP-2-62	80	M	IgG, C3	IgG, IgA	n.e.	275
BP-2-63	72	M	IgG, C3	IgG	IgG	1.886
BP-2-64	84	M	IgG	IgG	IgG	negativ
BP-2-65	74	W	IgG, C3	IgG	IgG	1.508
BP-2-66	81	M	IgG	IgG	IgG	450
BP-2-67	68	M	IgG	IgG	IgG	3.412
BP-2-68	69	W	IgG, C3	IgG	IgG	1.172
BP-2-69	81	W	IgG, C3	IgG	IgG	90
BP-2-70	86	W	IgG, C3	IgG	negativ	109
BP-2-71	63	W	C3	negativ	negativ	61
BP-2-72	72	W	IgG, C3	IgG	IgG	300
BP-2-73	54	M	C3	IgG	IgG	116
BP-2-74	85	W	IgG	IgG	IgG	negativ
Summe der positiven			73	67	63	62

Aufgeführt sind die Ergebnisse der im Vorfeld bei Erstdiagnose erhobenen Befunde der DIF, der IIF auf Spalthaut und auf Affenösophagus, sowie die Ergebnisse der im Vorfeld erhobenen Anti-BP180 NC16A IgG und Anti-BP230.IgG ELISA. Weiterhin aufgelistet sind das Alter und das Geschlecht. DIF, direkte Immunfluoreszenz, IIF, indirekte Immunfluoreszenz, n.e., nicht erfolgt.

Zusätzlich standen 80 Seren von konsekutiven BP Patienten zur Verfügung (Kohorte 3), die im Jahr 2017 am Uniklinikum Lübeck in der Abteilung für Dermatologie nach vorheriger Einwilligung der Patienten asserviert wurden. Das Alter der Patienten lag zwischen 58 und 102 Jahren, der Durchschnitt lag bei 80,4 Jahren. In der Kohorte lagen uns bei 22 von 80 Seren (27,5 %). Informationen zur DIF vor.

Tab. 4 Darstellung der konsekutiven BP Patienten Erstdiagnose (Kohorte 3)

Patient	Alter	Geschlecht	DIF	IIF Spalthaut	IIF Affenösophagus	Anti-BP180 NC16A ELISA
BP-3-1	69	M	n.e.	IgG	IgG	153
BP-3-2	77	M	n.e.	IgG	IgG	189
BP-3-3	93	W	n.e.	IgG	negativ	85
BP-3-4	70	M	negativ	IgG	IgG	1.041
BP-3-5	80	M	n.e.	IgG	IgG	658
BP-3-6	61	W	n.e.	IgG	IgG	48
BP-3-7	87	M	n.e.	IgG	IgG	negativ
BP-3-8	76	W	n.e.	IgG	IgG	550
BP-3-9	87	W	n.e.	negativ	IgG	negativ
BP-3-10	102	W	n.e.	IgG	IgG	197
BP-3-11	82	M	n.e.	IgG	IgG	negativ
BP-3-12	86	W	n.e.	IgG	IgG	60
BP-3-13	82	W	n.e.	IgG	IgG	117
BP-3-14	95	W	IgG	IgG	IgG	2.106

BP-3-15	87	M	n.e.	IgG	IgG	negativ
BP-3-16	77	M	n.e.	IgG	IgG	34
BP-3-17	58	M	n.e.	IgG	IgG	230
BP-3-18	69	M	n.e.	IgG	IgG	51
BP-3-19	94	W	n.e.	IgG	IgG	771
BP-3-20	90	W	n.e.	IgG	IgG	23
BP-3-21	85	M	n.e.	IgG	IgG	298
BP-3-22	84	W	n.e.	IgG	IgG	84
BP-3-23	77	M	n.e.	IgG	IgG	124
BP-3-24	89	W	IgG	IgG	IgG	169
BP-3-25	76	W	n.e.	IgG	IgG	77
BP-3-26	82	M	n.e.	IgG, IgA	IgG	159
BP-3-27	61	W	n.e.	IgG	IgG	66
BP-3-28	79	M	n.e.	IgG	IgG	negativ
BP-3-29	63	W	n.e.	IgG	IgG	36
BP-3-30	78	W	IgG	IgG	IgG	negativ
BP-3-31	94	W	n.e.	IgG	IgG	1.417
BP-3-32	62	M	C3	IgG	IgG	290
BP-3-33	61	M	IgG	IgG	IgG	46
BP-3-34	80	W	IgG, C3	IgG	IgG	112
BP-3-35	70	W	n.e.	IgG	negativ	negativ
BP-3-36	78	W	IgG, C3	IgG	IgG	72
BP-3-37	91	W	n.e.	IgG	IgG	negativ
BP-3-38	82	M	n.e.	IgG	IgG	negativ
BP-3-39	86	M	negativ	negativ	IgG	171
BP-3-40	82	W	n.e.	IgG	IgG	negativ
BP-3-41	78	W	IgG, C3	IgG	IgG	85
BP-3-42	71	W	IgG, C3, IgM	IgG	IgG	114
BP-3-43	59	W	n.e.	negativ	IgG	152
BP-3-44	84	M	n.e.	IgG	IgG	200
BP-3-45	92	W	n.e.	IgG	IgG	1.138
BP-3-46	91	W	n.e.	IgG	IgG	negativ
BP-3-47	89	M	negativ	negativ	negativ	negativ
BP-3-48	92	W	n.e.	IgG	IgG	188
BP-3-49	66	M	n.e.	negativ	negativ	1.575
BP-3-50	86	W	n.e.	IgG	negativ	58
BP-3-51	89	M	negativ	negativ	negativ	negativ
BP-3-52	78	M	n.e.	IgG	IgG	negativ
BP-3-53	89	M	n.e.	IgG	IgG	282
BP-3-54	76	M	n.e.	IgG	IgG	174
BP-3-55	78	W	IgG, C3, IgM	IgG	IgG	1.118
BP-3-56	82	W	negativ	negativ	negativ	67
BP-3-57	91	M	n.e.	IgG	IgG	639
BP-3-58	86	M	n.e.	IgG	IgG	negativ
BP-3-59	78	M	n.e.	IgG	IgG	738
BP-3-60	82	M	n.e.	IgG	IgG	negativ
BP-3-61	83	M	IgG, C3	negativ	negativ	negativ
BP-3-62	75	M	n.e.	IgG	negativ	25
BP-3-63	58	M	IgG, IgM	IgG	IgG	1.584

BP-3-64	78	W	n.e.	IgG	IgG	negativ
BP-3-65	76	W	n.e.	IgG	IgG	348
BP-3-66	86	M	n.e.	IgG	IgG	195
BP-3-67	84	M	n.e.	IgG	IgG	74
BP-3-68	95	W	negativ	IgG	IgG	1.160
BP-3-69	59	M	IgG	negativ	IgG	397
BP-3-70	77	W	IgG	IgG	IgG	negativ
BP-3-71	85	W	IgG, C3	IgG	IgG	397
BP-3-72	82	M	n.e.	IgG	IgG	negativ
BP-3-73	80	W	n.e.	IgG	IgG	negativ
BP-3-74	91	W	n.e.	IgG	IgG	1.062
BP-3-75	74	M	n.e.	IgG	negativ	257
BP-3-76	76	M	n.e.	IgG	IgG	44
BP-3-77	89	M	n.e.	IgG	IgG	122
BP-3-78	79	M	negativ	IgG	IgG	57
BP-3-79	91	W	negativ	IgG	IgG	96
BP-3-80	91	W	n.e.	IgG	IgG	379
Summe der positiven			15	71	70	59

DIF, direkte Immunfluoreszenz, IIF, indirekte Immunfluoreszenz, n.e., nicht erfolgt

Als Kontrollseren wurden 37 Seren von Patienten mit Schleimhautpemphigoid, 55 Seren von Patientinnen mit Pemphigoid gestationis (PG), 71 Seren von Müttern, welche innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt entnommen wurden, 50 Seren von gesunden Blutspendern und 40 Seren von Patienten mit Pemphigus vulgaris (PV) verwendet.

Die Seren von Patienten mit Schleimhautpemphigoid wurden in den Jahren 2009 bis 2017 am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in der Dermatologie nach vorheriger Einwilligung der Patienten gesammelt. Das Alter der Patienten lag zwischen 23 und 90 Jahren, es handelte sich um 20 Frauen und 16 Männer. Von den 37 Patienten mit Schleimhautpemphigoid wurde bei 26 Patienten bei Diagnosestellung eine DIF durchgeführt, hier zeigten sich bei 10 Patienten IgG Ablagerungen an der DEJ, bei 14 Patienten waren C3 Ablagerungen nachweisbar und bei 8 Patienten zeigten sich lineare IgA Ablagerungen an der DEJ. IgM Ablagerungen konnten bei keinem der Patienten nachgewiesen werden. Bei fünf Seren ließen sich keine Antikörper oder Komplementablagerungen an der DEJ nachweisen. Bei allen Patienten wurde eine IIF auf Spalthaut durchgeführt, diese war bei 14 positiv für IgG, 5 waren positiv für IgA und eine war sowohl für IgG als auch IgA positiv. Bei den insgesamt 20 positiven Seren banden die Antikörper bei 17 Seren im Blasendach, bei zwei Seren am Blasenboden und bei einem sowohl

am Blasenboden als auch am Blasendach. Bei 29 Patienten wurde zusätzlich der Anti-BP180 NC16A IgG ELISA durchgeführt, bei 14 Patienten konnten IgG Autoantikörper gegen BP180 NC16A nachgewiesen werden. Bei elf Seren wurde neben der DIF, der IIF und dem Anti-BP180 NC16A IgG ELISA auch der Anti-BP230 IgG ELISA durchgeführt, nur ein Serum zeigte sich positiv.

Zudem wurden Seren von 55 Patientinnen mit Pemphigoid gestationis untersucht, Diese Seren stammen aus den Universitätskliniken in Lübeck (n=14), Groningen (n=22), München (n=11), Würzburg (n=5) und Wien (n=3). Als Einschlusskriterien zählten hier die klinische Präsentation und ein positiver Komplementbindungstest und/oder ein positiver BP180 NC16A IgG ELISA, eine positive DIF war nicht erforderlich (Sadik et al., 2017). In derselben Studie wurden Seren von Müttern verwendet, welche innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck entnommen wurden (Sadik et al., 2017). Von den ehemals 101 Seren, war bei 71 Proben noch genug Serum vorhanden, um im BP230 IgE ELISA eine Einfachbestimmung und zusätzlich den Gesamt-IgE ELISA durchzuführen. Auch die Anti-BP180 IgG und IgE ELISA, sowie der Anti-BP230 IgG ELISA konnten mit dem vorhandenen Volumen noch durchgeführt werden.

Für die vorliegende Promotionsarbeit wurden 40 Seren von Patienten mit Pemphigus vulgaris untersucht, diese wurden in den Jahren 2016 und 2017 in der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie am Universitätsklinikum Lübeck gesammelt. Es handelte sich um 18 Männer und 22 Frauen, das Alter lag zwischen 68 und 89 Jahren. Auch bei diesen Seren wurden die Anti-BP230 IgE und IgG Antikörper, das Gesamt-IgE, sowie die Anti-BP180 IgG und IgE Antikörper bestimmt.

Die 50 Seren von Blutspendern stammen aus dem Institut für Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Lübeck. Sie wurden im Jahr 2019 entnommen. Das Alter der Blutspender liegt im Allgemeinen zwischen 18 und 68 Jahren. Bei allen Seren war noch genug Serum vorhanden, um neben dem Anti-BP230 IgE ELISA, auch den Anti-BP230 IgG ELISA, den Gesamt-IgE ELISA, sowie den Anti-BP180 IgG und IgE ELISA durchzuführen.

Insgesamt wurden für die vorliegende Arbeit Seren von 367 Patienten in der bereits beschriebenen Weise untersucht und die Ergebnisse bei den Seren von BP Patienten aus der Kohorte 2 mit der Krankheitsaktivität in Zusammenhang gebracht. Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck positiv beurteilt (Nr. 11-234, 12-178, 14-227 und 15-051).

3.3. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.3.1. Anti-BP230-IgE-ELISA

Für die quantitative Untersuchung der Anti-BP230 IgE Antikörper steht kein kommerzieller ELISA zur Verfügung. Es wurde der BP230 IgG ELISA (Euroimmun) mit 2 Modifikationen von den Herstellerangaben verwendet: 1. Als Detektionsantikörper verwendeten wir nicht den im ELISA-Kit enthaltenen Anti-IgG-Antikörper, sondern den Anti-IgE-Antikörper der Firma Euroimmun. 2. Anstatt die Seren zu verdünnen (1:101) setzten wir unverdünnte Seren gemäß den Vorarbeiten ein. Zu Beginn wurden zweimal 100 µl Sample Buffer als negativer Vergleichswert (im ELISA Kit enthalten) und zweimal 50 µl der unverdünnten Patientenseren auf die 96 Well Platte pipetiert und 30 min bei Raumtemperatur mit Klebefolie abgedeckt inkubiert, um die Reagenzien vor Austrocknung zu schützen. Anschließend wurden die Reagenzgefäße ausgeschüttet und jeweils dreimal mit je 300 µl Waschpuffer (bereits im Kit enthalten, 1:10 verdünnt) ausgewaschen. Der Waschpuffer wurde bei jedem Durchgang 30-60 sec im Reagenzgefäß belassen. Nach jedem abgeschlossenen Waschvorgang wurden die Reagenzgefäße mit den Öffnungen nach unten auf Vliespapier ausgeschlagen. Hierbei wurde besonders nach dem letzten Waschvorgang darauf geachtet, keine Flüssigkeitsreste im Gefäß zurückzulassen, da bereits kleine zurückgebliebene Reste zu falsch niedrigen Messwerten führen können. Im nächsten Schritt wurden 100 µl Enzymkonjugat-Lösung (Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgE) zugefügt und 30 min mit Klebefolie abgedeckt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Entleeren der Gefäße wurde der Waschvorgang wie zuvor durchgeführt. Anschließend wurden je 100 µl Chromogen/Substrat-Lösung in die Reagenzgefäße pipettiert. Es folgte eine Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur, dabei wurde darauf geachtet, dass die Gefäße mit Klebefolie abgedeckt und im Dunkeln gelagert wurden. Um die Reaktion zu beenden, wurden je 100 µl gebrauchsfertige Stopplösung hinzugegeben. Die photometrische Auslesung erfolgte innerhalb von 30 min nach dem Stoppen der Reaktion am ELISA Reader (GloMax) bei 450 nm Messwellenlänge. Die Probenwerte ergaben sich aus der Extinktion der Probe nach Abzug des Leerwertes (Sample buffer) und wurden im Zusammenhang mit ihrem Gesamt-IgE Wert, welcher mittels ELISA (Euroimmun) bestimmt wurde, ausgewertet.

3.3.2. Gesamt-IgE-ELISA

Für die quantitative Bestimmung des Gesamt-IgE-Serumspiegels wurde der ELISA der Firma Euroimmun eingesetzt. Dieser wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Zu Beginn wurden entsprechend des Pipettierschemas jeweils 100 µl der vier Kalibratoren (K1-4, im Kit enthalten), zwei Positivkontrollen (P1 +2, im Kit enthalten) und je 100 µl verdünnter Patientenseren (1:10) in die Reagenzgefäße pipettiert. Im Anschluss folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur, bei dieser wurden die Reagenzgefäße mit Klebefolie abgedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Anschließend wurden die Gefäße mit je 300 µl Waschpuffer (bereits im Kit enthalten, 1:10 verdünnt) dreimal ausgewaschen (genaue Durchführung siehe BP230-IgE-ELISA). Dem Waschvorgang folgte die Zugabe von 100 µl Enzymkonjugat (Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgE, bereits im Kit enthalten). Nach einer Inkubation über 30 min bei Raumtemperatur unter Klebefolie folgte ein weiterer Waschschrift mit je dreimal 300 µl Waschpuffer (siehe oben). Im Anschluss wurde jedem Reagenzgefäß 100 µl Chromogen/Substratlösung (im Kit enthalten) zugefügt. Die 15-minütige Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur unter Abdunkelung und Abdeckung mit Klebefolie. Die Messung erfolgte nach Zufügen von der bereits im Kit enthaltenen Stopplösung mit dem ELISA Reader (Opsys MR) bei 450 nm. Die Umrechnung der Extinktion in U erfolgte durch die Relevation Software QuickLink 24077. Der obere Grenzwert lag bei 500 U/ml, eine Austitrierung bei höheren Werten erfolgte nicht.

3.3.3. Anti-BP180 NC16A-IgE-ELISA

Der BP180 NC16A IgE ELISA wurde bereits von van Beek et al etabliert (van Beek et al., 2017b). Hierbei wurden zur Quantifizierung der Anti-BP180 IgE Antikörper der BP180 NC16A IgG ELISA und der IgE Detektionsantikörper der Firma Euroimmun eingesetzt. Je 30 µl Aqua dest, je 30 µl unverdünnte Seren von 2 Positiv- und 2 Negativkontrollen und 100 µl unverdünnte Patientenseren wurden auf die 96 Well Platte pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur unter Klebefolie und einem dreifachem Waschschrift (s.o.) wurden jeweils 100 µl Enzymkonjugat hinzu pipettiert, es schloss sich eine weitere Inkubationszeit von 30 min unter Klebefolie bei Raumtemperatur an. Nach einem erneuten Waschschrift wurden je 100 µl Chromogen/ Substratlösung zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min unter Abdunkelung wurden je 100 µl Stopplösung in die Wells pipettiert und im ELISA Reader (Opsys MR) bei 450 nm gemessen. Bei der Etablierung wurden drei Grenzwerte anhand des Gesamt-IgE festgelegt (siehe Tab. 4).

Tab. 5 Grenzwerte des Anti-BP180 NC16A IgE ELISA in Abhängigkeit vom Gesamt-IgE

Gesamt IgE	Probenwert positiv ab
<100	0,04
100-500	0,13
>500	0,17

3.3.4. Anti-BP230-IgG-ELISA

Zur quantitativen Bestimmung der IgG-Autoantikörper gegen BP230 wurde das hierfür vorgesehene ELISA-Kit der Firma Euroimmun verwendet und wie oben beschrieben, ohne Modifikationen nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Umrechnung von Extinktion in U/ml erfolgte durch die Relevation Software Quick Link 24077. Ab einem Wert von 20 U/ml werteten wir, wie durch den Hersteller empfohlen, den Wert als positiv. Der obere Grenzwert lag bei 200 U/ml, eine weitere Austitrierung erfolgte nicht (Blöcker et al., 2012).

3.3.5. Anti-BP180 NC16A-IgG ELISA

Für eine quantitative Bestimmung der IgG-Antikörper gegen BP180 wurde das ELISA-Kit der Firma Euroimmun verwendet und wie oben beschrieben, ohne Modifikationen nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Umrechnung von Extinktion in U/ml erfolgte durch die Relevation Software Quick Link 24077. Ab einem Wert von 20 U/ml werteten wir, wie durch den Hersteller empfohlen, den Wert als positiv. Auch hier lag der obere Grenzwert bei 200 U/ml, auch hier wurde bei höheren Werten keine Austitrierung durchgeführt (Sitaru et al., 2007).

3.4. Bullous Pemphigoid Disease Area Index (BPDAI)

Der BPDAI (siehe Abb. 8) wurde im Jahr 2012 von einer Gruppe von Experten auf dem Gebiet des BP entwickelt. Dieser Score sollte dazu dienen, das Ausmaß und das klinische Bild in Fallberichten und in klinischen Studien einheitlicher darzustellen. Eingeteilt wird der BPDAI in die drei Überkategorien „Haut“, „Schleimhaut“ und „Pruritus“. Es können in der Kategorie „Haut“ je nach Krankheitsaktivität insgesamt bis zu 252 Punkte vergeben werden, je 120 davon in den Unterkategorien „Aktivität Blasen/Erosionen“ und „Aktivität Urtikaria/ Erythem/ Andere“ und 12 Punkte für den „Schaden Pigmentierung/ andere“. In der Kategorie „Schleimhaut“ reicht der Score bis 120. Beim „Pruritus“ können bis zu 30 Punkte vergeben werden (Murrell et al., 2012).

Bei den meisten Patienten wurde der BPDAI bereits bei Erstdiagnose sowie bei weiteren Vorstellungen in unserer Klinik erhoben. Bei 5 Patienten wurde kein BPDAI zum Zeitpunkt der Erstdiagnose erhoben, dieser konnte retrospektiv anhand von Beschreibungen in den Arztbriefen und/oder anhand von Fotos, die bei dem entsprechenden stationären Aufenthalt oder ambulanten Terminen aufgenommen wurden, ermittelt werden.

BPDAI					
SKIN	ACTIVITY		ACTIVITY		DAMAGE
Anatomical location	Erosions/Blisters	Number of Lesions if <3	Urticaria/ Erythema / Other	Number of Lesions if <3	Pigmentation/ Other
	0 absent		0 absent		Absent 0, present 1
	1 1-3 lesions, none > 1 cm diameter		1 1-3 lesions, none >6 cm diameter		
	2 1-3 lesions, at least one > 1 cm diameter		2 1-3 lesions, at least one lesion > 6 cm diameter		
	3 >3 lesions, none > 2 cm diameter		3 >3 lesions, or at least one lesion > 10 cm diameter		
	5 >3 lesions, and at least one >2 cm		5 >3 lesions and at least one lesion > 25 cm diameter		
	10 >3 lesions, and at least one lesion >5 cm diameter or entire area		10 >3 lesions and at least one lesion > 50 cm diameter or entire area		
Head					
Neck					
Chest					
Left arm					
Right arm					
Hands					
Abdomen					
Genitals					
Back/Buttocks					
Left leg					
Right leg					
Feet					
Total skin	/120		/120		
MUCOSA	Erosions/Blisters				
	1 1 lesion				
	2 2-3 lesions				
	5 >3 lesions, or 2 lesions >2cm				
	10 entire area				
Eyes					
Nose					
Buccal mucosa					
Hard palate					
Soft palate					
Upper gingiva					
Lower gingiva					
Tongue					
Floor of Mouth					
Labial Mucosa					
Posterior Pharynx					
Anogenital					
Total Mucosa	/120				

Abb. 8 Darstellung des BPDAI

Abbildung entnommen aus Murrell et al. 2012

3.5. Statistische Analysen

Die ROC-Analyse wurde mithilfe des Programms Gnu R open-access statistical software (version 3.1; R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing <https://cran.r-project.org>) durchgeführt.

Die Korrelationsanalysen wurden von Dr. Nina van Beek und PD Dr. Andreas Recke durchgeführt. Hierfür wurde das Programm Gnu R open-access statistical software (Version 3.1; R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing <https://cran.r-project.org/>) mit den zusätzlichen Funktionen „base“, „irr“, „stats“, „utils“, „survival“ verwendet. Die interindividuelle Korrelation wurde mittels Correlation test method = spearman, exact = F berechnet, die intraindividuelle Korrelation mittels Approximate Spearman Correlation Test stratified per patient. Zur Berechnung des Variationskoeffizienten teilten wir die Standardabweichung durch den Mittelwert (Horstmann, 2016).

Für alle Analysen wurden die Ergebnisse der Anti-BP180 NC16A IgG und der Anti-BP230 IgG ELISA <2 U/ml auf 2 U/ml, der Gesamt-IgE ELISA >500 U/ml auf 500 U/ml und >200 U/ml auf 200 U/ml gesetzt. Für die Anti-BP230 IgE und Anti-BP180 NC16A IgE ELISA wurde die optische Dichte verwendet.

3.6. Immunoblot

Der Immunoblot ist eine Methode, um Antikörper im Serum nachzuweisen. Nachdem die entsprechenden Antigene auf eine Nitrozellulose Membran transferiert wurden, binden die Antikörper im ersten Schritt an diese Antigene. Im zweiten Schritt bindet der Zweitantikörper an die gebundenen Antikörper. Abschließend werden die Antikörper durch eine Färbereaktion sichtbar gemacht. Es wurden Immunoblots mit 7 Fragmenten des BP230 durchgeführt, die von der Firma

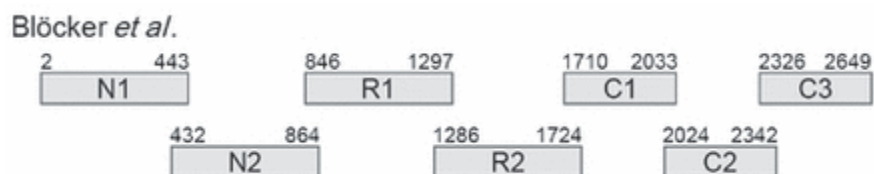


Abb. 9 Darstellung der 7 für den Immunoblot verwendeten Fragmente von BP230
Blöcker et al 2012 [13].

Euroimmun zur Verfügung gestellt wurden, es handelte sich um die Fragmente, die

bereits Blöcker et al. für die Entwicklung eines Anti-BP230 IgG ELISA verwendet hatten (Abb. 9) (Blöcker et al., 2012).

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die verschiedenen Fragmente des BP230 von möglichen Verunreinigungen zu trennen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Nach der Herstellung und dem Gießen des 12%-igen Trenngels in eine vertikale Gelkammer wurde dies mit Aqua dest übergossen, um eine glatte Oberfläche zu erhalten und das Gel zu verdichten. Im Anschluss an die Polymerisationszeit von 15-20 Minuten wurde das Aqua dest wieder abgegossen und das Trenngel mit dem 4%-igen Sammelgel beschichtet, in das Sammelgel wurde vorsichtig ein Probenkamm eingeführt. Ungefähr 15 Minuten später konnte das Gel mit den Proben beladen werden. Die Proben wurden zuvor 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend ca. 1 Minute zentrifugiert. Als Kontrolle wurde ein farbmarkierter Protein-Standard der Firma Bio-Rad Laboratories verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte zunächst für ca. 20 Minuten bei 25 mA, um die Proteine langsam in die Gele einlaufen zu lassen, anschließend bei 50 mA. Im ersten Durchgang wurden 5-Taschengele hergestellt und in aufsteigender Menge jeweils 10 µl, 20 µl, 30 µl und 40 µl der jeweiligen Proteinfragmentprobe in die Taschen gefüllt. Hiermit sollte die optimale Proteinmenge für den Immunoblot ermittelt werden. Im zweiten Durchgang wurde ein 1-Taschengel hergestellt und die ermittelte Menge Protein aufgetragen.

Westernblot

Für den Transfer wurden zwei Faserschwämme der Firma Bio Rad, zwei Blot-Filterpapiere der Firma Schleicher und Schuell GmbH, das Trenngel und die Nitrozellulosemembran sandwichartig in der Blotkassette der Firma Bio Rad zusammengebaut, dabei war darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen den einzelnen Elementen vorhanden waren. Der Transfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte über eine Stunde bei -4°C und 120 V. Im Anschluss wurde die Nitrozellulosemembran mit Fast Green der Firma Sigma-Aldrich Chemie gefärbt, um den Transfer zu überprüfen und die Proteinbanden sichtbar zu machen.

Immunoblot

Aus der Nitrozellulosemembran wurde die benötigte Anzahl an ca. 2 mm breiten Streifen geschnitten, beschriftet und in eine Inkubationsschale gelegt. Jeder Streifen wurde mit 1 ml TBST-Lösung mit 5% Magermilchpulver (MMP) beides von der Firma Merck KGaA getränkt und bei Raumtemperatur 1 Stunde inkubiert. Hierdurch sollten unspezifische Bindungsstellen blockiert werden. Die TBST-Lösung mit MMP wurde anschließend ausgeschüttet und die Streifen 3x10 Sekunden mit TBST gespült. Im Anschluss wurden die Streifen mit 1:100 verdünnten Serumproben (10 µl Serum und 990 µl TBST mit 1% BSA und 5% MMP) über Nacht (ca. 16 Stunden) bei 4°C im Kühlraum auf dem Schüttler bei 20-30 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Flüssigkeit abgegossen und die Streifen 3x10 Sekunden mit TBST gespült. Das TBST wurde anschließend ausgeschüttet und in jede Schale etwas frisches TBST gefüllt, die Wannens wurden nun für 12 Minuten auf den Schütteltisch der Firma Heidolph Instruments bei einer Geschwindigkeit von 20-30 rpm gestellt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Daraufhin wurden die Streifen in ein 50 ml Falcon der Firma Sarstedt gelegt und mit verdünnten Anti-IgE-Konjugat (1:1 mit TBST + 5 % MMP + 1% BSA verdünnt) beschichtet. Es folgte eine Inkubation über 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bei 20-30 rpm. Im Anschluss an zwei Waschvorgänge (s.o.) wurden die Streifen auf eine Klarsichtfolie aufgeklebt und mit TBST befeuchtet. In der Dunkelkammer wurden die Streifen mit ECL der Firma GE Medical Systems Information Technologies GmbH bedeckt (Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:1) und für 1 Minute inkubiert. Die ECL Lösung wurde anschließend abgetupft. In die x-Ray-Film-Kassette wurde die Klarsichtfolie mit den Streifen abgedeckt mit einer zweiten Klarsichtfolie und dem Film hineingelegt und verschlossen. Nach 7 Minuten wurde der Film wieder entnommen, für ca. 1 Minute in den Entwickler der Firma BW Plus Röntgen GmbH & Co. KG, dann 10 Sekunden in Leitungswasser, ca. 60 Sekunden in den Fixierer der Firma BW Plus Röntgen GmbH & Co. KG und abschließen 2 Minuten in Leitungswasser zum Neutralisieren gelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des Anti-BP230-IgE ELISAs

Zunächst wurde der Anti-BP230 IgE ELISA mit sechs Seren an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführt, um die Interassay Variabilität zu ermitteln. Es ergab sich ein Variationskoeffizient von 7,3%, dies spricht für eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (siehe Tab. 6).

Tab. 6: Berechnung des Variationskoeffizienten.

Serumnummer	Anti-BP230 IgE (OD) Tag 1	Anti-BP230 IgE (OD) Tag 2	Anti-BP230 IgE (OD) Tag 3	Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeffizient (Standardabweichung/Mittelwert)
1	1,92	1,76	1,84	1,84	0,08	0,04
2	1,26	1,26	1,37	1,30	0,06	0,05
3	0,71	0,66	0,72	0,70	0,03	0,04
4	0,78	0,71	0,77	0,75	0,03	0,04
5	0,07	0,08	0,08	0,08	0,01	0,13
6	0,07	0,07	0,08	0,07	0,01	0,14
Gesamt-Variationskoeffizient:						0,073

OD, optische Dichte

Nach Etablierung des Anti-BP230 IgE ELISA untersuchten wir 2 Kohorten von BP Patienten, Seren von Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (Kohorte 2).

Seren von konsekutiven Patienten unabhängig vom Zeitpunkt im Krankheitsverlauf (Kohorte 3)

18% der BP Patienten haben bei Erstdiagnose IgE-Autoantikörper gegen BP230

Es wurden 74 Seren von BP Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (Kohorte 2) auf das Vorhandensein von Anti-BP230 IgE, Anti-BP230 IgG, Anti-BP180 NC16A IgE und Anti-BP180 NC16A IgG Antikörper untersucht. Des Weiteren wurde der Gesamt-IgE ELISA-Titer bestimmt (siehe Tab. 7).

Bei 13 Seren (17,6%) wurden IgE Antikörper gegen BP230 nachgewiesen. Der Höchstwert lag bei 2,35 OD-b (Erläuterung siehe Seite 24) der niedrigste positive Wert bei 0,27 OD. In keinem der Seren konnten ausschließlich Anti-BP230 IgE Autoantikörper nachgewiesen werden.

Tab. 7 Ergebnisse der verschiedenen ELISA bei BP Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (Kohorte 2).

Patient	Anti-BP230 IgE Antikörper in OD-b	Gesamt-IgE in U/ml	Anti-BP230 IgG Antikörper in U/ml	Anti-BP180 IgE Antikörper in OD-b
BP-2-1	1,35	>500,0	19,8	0,26
BP-2-2	-0,01	24,5	6,1	0,25
BP-2-3	3,13	>500,0	102,4	0,15
BP-2-4	-0,01	128,3	0,0	0,05
BP-2-5	1,52	>500,0	>200,0	0,64
BP-2-6	-0,01	>500,0	>200,0	0,06
BP-2-7	0,36	>500,0	134,7	0,10
BP-2-8	0,00	17,4	36,0	0,08
BP-2-9	0,02	58,0	<2,0	0,24
BP-2-10	0,00	7,3	147,0	0,05
BP-2-11	0,01	64,7	178,0	0,08
BP-2-12	0,70	66,9	42,0	0,05
BP-2-13	-0,01	>500,0	149,1	0,43
BP-2-14	0,00	37,4	<2,0	0,09
BP-2-15	0,09	22,9	<2,0	0,10
BP-2-16	0,00	39,2	67,0	0,05
BP-2-17	0,06	>500,0	>200,0	0,09
BP-2-18	0,02	>500,0	2,1	0,07
BP-2-19	0,03	28,7	<2,0	0,51
BP-2-20	0,01	105,6	11,0	0,17
BP-2-21	0,02	12,4	<2,0	0,09
BP-2-22	0,00	69,5	<2,0	0,06
BP-2-23	0,09	18,4	>200,0	0,73
BP-2-24	0,00	75,9	3,9	0,13
BP-2-25	0,00	>500,0	2,0	0,13
BP-2-26	0,02	>500,0	101,0	0,07
BP-2-27	0,00	141,0	35,7	1,01
BP-2-28	0,08	0,1	>200,0	0,05
BP-2-29	0,00	>500,0	<2,0	0,28
BP-2-30	0,07	306,2	<2,0	0,05
BP-2-31	0,08	>500,0	151,0	0,05

BP-2-32	0,00	>500,0	82,0	0,07
BP-2-33	0,03	>500,0	175,6	0,09
BP-2-34	0,00	0,2	16,9	0,07
BP-2-35	0,16	>500,0	>200,0	0,00
BP-2-36	0,01	98,1	37,7	0,39
BP-2-37	0,00	37,2	0,0	0,04
BP-2-38	0,00	>500,0	2,5	-0,02
BP-2-39	0,01	346,7	>2,0	0,19
BP-2-40	0,05	364,5	>500,0	-0,02
BP-2-41	2,35	>500,0	101,6	0,07
BP-2-42	0,02	4,1	48,3	0,02
BP-2-43	0,56	>500,0	>200,0	0,03
BP-2-44	0,01	13,9	7,9	-0,01
BP-2-45	0,01	140,1	<2,0	0,59
BP-2-46	0,03	17,4	85,7	0,04
BP-2-47	0,03	37,4	<2,0	0,20
BP-2-48	0,00	11,2	4,2	0,12
BP-2-49	0,79	>500,0	43,5	0,00
BP-2-50	0,00	>500,0	8,8	0,20
BP-2-51	0,01	141,2	2,8	0,00
BP-2-52	0,01	65,8	4,6	0,02
BP-2-53	0,01	39,9	<2,0	0,09
BP-2-54	1,85	>500,0	103,8	0,25
BP-2-55	-0,01	52,2	<2,0	-0,02
BP-2-56	0,01	43,4	2,5	0,01
BP-2-57	-0,01	57,2	<2,0	0,02
BP-2-58	0,02	88,7	101,3	0,00
BP-2-59	0,02	2,7	<2,0	0,01
BP-2-60	0,07	>500,0	12,9	0,68
BP-2-61	0,29	>500,0	8,5	0,57
BP-2-62	0,37	>500,0	69,9	-0,01
BP-2-63	-0,01	50,8	<2,0	0,02
BP-2-64	0,01	84,4	4,3	-0,01
BP-2-65	0,02	67,9	>200,0	0,00
BP-2-66	0,00	51,7	116,7	0,00
BP-2-67	0,82	>500,0	140,5	0,00
BP-2-68	1,84	33,4	20,6	0,37
BP-2-69	0,01	11,3	>200,0	-0,01
BP-2-70	0,02	99,2	<2,0	0,11
BP-2-71	0,01	4,0	<2,0	0,04
BP-2-72	0,28	85,0	158,5	0,01
BP-2-73	0,27	44,7	30,4	0,28
BP-2-74	0,01	121,1	6,2	0,00

OD-b, optische Dichte abzüglich der optischen Dichte des Leerwertes.

Ungefähr 29% konsekutiver BP Patienten zeigen Anti-BP230 IgE Autoantikörper

80 Seren von konsekutiven Patienten mit BP wurden auf das Vorhandensein von Anti-BP230-IgE- und Anti-BP230-IgG-, Anti-BP180-IgE -und Anti-BP180-IgG-Antikörpern untersucht und das Gesamt-IgE bestimmt. Dabei wurden Anti-BP230-IgE Antikörper bei 23 Proben (28,8%) nachgewiesen. Die Diskrepanz zu Kohorte 2 könnte unter anderem mit einem Class switch hindeuten, bei dem sich die Reaktivität der Autoantikörper gegen verschiedene Epitope im Laufe der Zeit unter dem Einfluss diverser Faktoren verändert. Von diesen 23 Proben waren 9 (39,1%) zusätzlich auch positiv für BP180 IgE Antikörper, insgesamt zeigten sich bei 31 (38,8%) Patienten Anti-BP180 NC16A IgE Antikörper. Patienten, die für beide IgE-Autoantikörper positiv waren, zeigten ein erhöhtes Gesamt-IgE. Insgesamt war das Gesamt-IgE bei 43 (53,8%) Patienten erhöht. In 47 (58,8%) Seren waren Anti-BP230 IgG Antikörper detektierbar. Bei 59 (73,8%) Patienten konnten Anti-BP180 NC16A IgG nachgewiesen werden

Tab. 8 Ergebnisse der verschiedenen ELISA bei konsekutiven BP Patienten (Kohorte 3).

Patient	Anti-BP230 IgE Antikörper in OD-b	Gesamt-IgE in U/ml	Anti-BP230 IgG Antikörper in U/ml	Anti-BP180 IgE Antikörper in OD-b
BP-3-1	0,19	436,8	16,1	0,17
BP-3-2	0,40	372,8	183,2	0,05
BP-3-3	0,01	54,9	2,4	0,35
BP-3-4	0,07	48,7	573,9	0,01
BP-3-5	0,78	>500	192,0	0,13
BP-3-6	2,34	>500	112,3	0,37
BP-3-7	0,06	64,4	<2,0	0,04
BP-3-8	0,69	>500	100,4	0,05
BP-3-9	0,04	123,3	<2,0	0,28
BP-3-10	0,10	97,2	105,8	0,06
BP-3-11	0,08	48,5	144,0	0,07
BP-3-12	1,82	>500	97,0	0,43
BP-3-13	0,54	>500	13,3	0,19
BP-3-14	0,86	>500	110,5	0,11
BP-3-15	0,07	16,8	<2,0	0,08
BP-3-16	0,06	11,1	15,7	0,08
BP-3-17	0,12	47,7	13,6	0,03
BP-3-18	0,07	>500	75,4	2,66
BP-3-19	0,11	54,0	120,5	0,05
BP-3-20	0,04	122,5	21,0	0,03
BP-3-21	0,12	79,8	75,4	0,03
BP-3-22	0,40	445,6	120,5	0,42
BP-3-23	0,03	52,0	<2,0	0,07
BP-3-24	0,29	376,5	88,0	0,05

BP-3-25	0,07	15,9	47,0	0,04
BP-3-26	0,17	>500	23,1	0,14
BP-3-27	0,03	18,9	2,7	0,02
BP-3-28	0,06	86,1	60,0	0,03
BP-3-29	0,00	9,8	2,4	0,01
BP-3-30	0,02	13,1	<2,0	0,00
BP-3-31	0,65	>500	129,1	0,09
BP-3-32	0,04	173,7	432,2	0,01
BP-3-33	0,01	>500	<2,0	0,70
BP-3-34	0,42	>500	25,0	0,97
BP-3-35	0,00	104,5	<2,0	0,01
BP-3-36	0,14	173,2	122,3	0,01
BP-3-37	0,10	82,8	48,0	0,01
BP-3-38	0,02	16,1	<2,0	0,01
BP-3-39	0,06	>500	4,8	1,12
BP-3-40	0,00	36,5	43,0	0,02
BP-3-41	0,01	16,7	36,0	0,29
BP-3-42	0,13	232,8	12,8	0,31
BP-3-43	0,01	4,1	2,3	0,00
BP-3-44	0,18	>500	1175,7	0,02
BP-3-45	0,00	93,2	6,1	0,06
BP-3-46	1,06	>500	30,0	0,11
BP-3-47	0,01	34,6	55,0	0,00
BP-3-48	0,13	>500	20,0	0,02
BP-3-49	-0,01	>500	<2,0	0,50
BP-3-50	0,00	31,9	9,0	0,01
BP-3-51	0,01	32,8	55,0	0,05
BP-3-52	0,02	22,9	<2,0	0,02
BP-3-53	0,07	31,7	<2,0	0,05
BP-3-54	0,66	>500	118,5	0,87
BP-3-55	0,01	116,8	<2,0	0,06
BP-3-56	0,01	126,2	65,0	0,03
BP-3-57	0,17	>500	91,4	0,13
BP-3-58	0,60	>500	40,0	0,07
BP-3-59	1,85	>500	187,3	0,25
BP-3-60	0,01	13,2	99,0	0,04
BP-3-61	0,01	8,2	<2,0	0,07
BP-3-62	0,00	156,2	23,0	0,02
BP-3-63	0,61	>500	145,0	0,03
BP-3-64	0,01	84,3	<2,0	0,01
BP-3-65	0,27	240,5	163,7	0,05
BP-3-66	0,05	1,1	9,7	0,00
BP-3-67	0,01	33,3	36,2	0,02
BP-3-68	0,03	55,3	42,4	0,01
BP-3-69	0,01	10,1	<2,0	0,04
BP-3-70	0,56	>500	95,0	0,02
BP-3-71	0,81	>500	1641,2	0,02
BP-3-72	0,04	369,3	<2,0	0,05
BP-3-73	0,01	90,4	<2,0	0,02
BP-3-74	1,08	>500	866,6	0,14
BP-3-75	0,01	44,5	<2,0	0,18
BP-3-76	1,02	229,3	68,0	0,01
BP-3-77	0,00	409,5	7,2	0,22

BP-3-78	0,00	8,1	<2,0	0,01
BP-3-79	0,46	260,3	97,0	0,92
BP-3-80	0,31	>500	1183,1	0,01

OD-b, optische Dichte abzüglich der optischen Dichte des Leerwertes

Insgesamt waren 59 (73,8%) Seren positiv für Anti-BP180 NC16A IgG Antikörper, der niedrigste Wert lag bei 26 U/ml, der höchste bei >200 U/ml. Bei 36 (48,7%) Seren ließen sich IgG Antikörper gegen BP230 nachweisen, hier lag der niedrigste

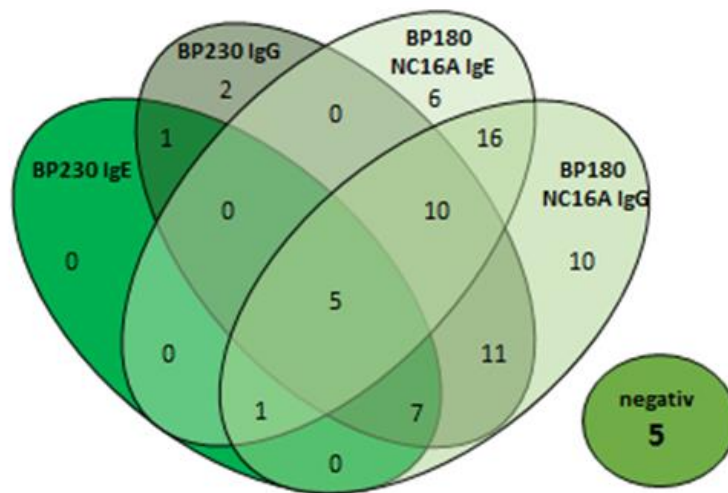


Abb. 10 Venn-Diagramm der Ergebnisse der BP180 NC16A und BP230 IgG und IgE ELISA der BP Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (Kohorte 2). Die fünf negativen Seren wurden zuvor positiv im Immunoblot mit LAD-1 getestet.

Wert bei 20,6 U/ml und der höchste bei >200 U/ml. 38 (51,4%) Patienten zeigten IgE Autoantikörper gegen BP180 NC16A mit dem Minimum bei 0,04 OD-b und dem Maximum bei 1,01 OD-b. Das Gesamt-IgE war bei 34 (46,0%) Seren mit Werten zwischen 105,6 U/ml und >500 U/ml erhöht. Abb. 10 fasst die Ergebnisse der ELISA zusammen. Die Aktivität der Krankheit gemessen mit dem BPDAl schwankte zwischen 0 und 111, wobei der Mittelwert bei 26 lag. Der bereits entstandene Hautschaden bewegte sich 0 und 17, im Mittel lag er bei 2.

Für die weitere Beurteilung des Krankheitsverlaufs bei den Patienten, die Anti-BP230 IgE Autoantikörper aufwiesen, wählten wir sieben dieser Patienten aus, die sich mindestens noch zwei Mal nach der Erstdiagnose in unserer Autoimmunsprechstunde vorstellten. Und führten an den Seren der Verlaufsvisiten

noch einmal alle erwähnten ELISA durch. Die Verlaufsseren wurden im Mittel 2,2 (1,5-3) Monate und 5,1 (4-7) Monate nach Erstdiagnose entnommen. Es zeigte sich eine intraindividuelle Korrelation zwischen der Höhe der Anti-BP230 IgE Antikörper und der Krankheitsaktivität (Approximative Spearman Correlation Test, $p=0,013$).

Bei keinem von 37 Seren von Patienten mit gesichertem Schleimhautpemphigoid konnten IgE Antikörper gegen Anti-BP230 nachgewiesen werden, bei 10 (27,0 %, 102,9 U/ml - >500 U/ml) Patienten lag ein erhöhtes Gesamt-IgE vor. Bei 9 (24,3%) der Seren waren Anti-BP180 IgG Antikörper nachweisbar, bei 5 (13,5%) Seren konnten IgG Antikörper gegen BP230 nachgewiesen werden und 2 (5,4%) Seren wiesen IgE Antikörper gegen BP180 NC16A auf.

Bei 55 Seren der Kontroll-Patientinnen mit PG konnten weder IgE noch IgG Autoantikörper gegen BP230 nachgewiesen werden. Bei 35 (63,6%) Seren zeigten sich IgG Antikörper gegen BP180 NC16A, das Gesamt-IgE war bei 23 (41,8%) Seren oberhalb des Referenzwertes, wobei die positiven Werte zwischen 132,8 U/ml und >500 U/ml lagen. Der Anti-BP180 NC16A IgE ELISA konnte aus Mangel an Serum nur noch bei 40 Seren durchgeführt werden, bei 5 (12,5%) von diesen Seren fiel der ELISA positiv aus.

Die Seren von Patientinnen nach der Geburt wiesen weder IgG noch IgE Antikörper gegen BP230 oder BP180 NC16A auf, bei sechs (8,5%) Seren ließ sich ein Gesamt-IgE oberhalb des Referenzwertes nachweisen, der niedrigste positive Wert lag bei 105,8 U/ml, der höchste bei >500 U/ml.

Der Anti-BP230 IgE ELISA zeigte auch bei 40 PV Seren keine erhöhten Werte, nur bei zwei (5,0%) Seren konnte mit 333,28 U/ml und >500 U/ml ein erhöhtes Gesamt-IgE nachgewiesen werden. Bei je einem Serum konnten IgG Antikörper gegen BP230 bzw. BP180 NC16A nachgewiesen werden, IgE Antikörper gegen BP180 NC16A waren nicht detektierbar.

Bei 50 gesunden Blutspendern konnten weder IgG noch IgE Antikörper gegen BP230 oder BP180 NC16A gezeigt werden, bei sechs Seren (12,0%) von Blutspendern konnte ein erhöhtes Gesamt-IgE nachgewiesen werden, die Werte lagen hier zwischen 115,24 U/ml und >500 U/ml.

4.2. Korrelationsanalysen

Bei der Durchführung des Gesamt-IgE ELISA, des BP230 IgG und BP180 NC16A IgG ELISA wurde aufgrund des Mangels an Serum, auf eine Austitrierung bei Werten über 500 U/ml bzw. über 200 U/ml verzichtet, was zu bei den im Folgenden beschriebenen Ergebnissen der Korrelationsanalysen zu berücksichtigen ist.

In Tabelle 9 sind die BPDAl Werte zu sehen, auf deren Grundlage die Korrelation berechnet wurde.

Tab 9.: Werte des BPDAl der Kohorte 2 zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

Patient	BPDAl					
	Aktivität Blase/ Erosion	Aktivität Urtikae/ Erythem	Aktivität Mucosa	Aktivität Gesamt	Damage	Pruritus
BP-2-1	23	4	0	27	7	30
BP-2-2	20	8	0	28	0	10
BP-2-3	2	21	0	23	7	30
BP-2-4	18	5	5	28	0	30
BP-2-5	65	10	0	75	9	10
BP-2-6	21	4	0	25	3	20
BP-2-7	0	10	0	10	0	10
BP-2-8	22	10	0	32	4	20
BP-2-9	9	7	0	16	0	0
BP-2-10	0	10	0	10	0	30
BP-2-11	21	5	5	31	0	10
BP-2-12	0	0	0	0	0	20
BP-2-13	12	4	0	16	0	30
BP-2-14	0	0	2	2	0	0
BP-2-15	20	5	0	25	0	20
BP-2-16	8	17	0	25	0	10
BP-2-17	3	0	0	3	0	0
BP-2-18	4	0	2	6	5	20
BP-2-19	18	29	0	47	9	20
BP-2-20	12	4	0	16	0	0
BP-2-21	2	0	0	2	0	0
BP-2-22	10	0	1	11	4	0
BP-2-23	32	0	0	32	0	30
BP-2-24	2	3	0	5	0	0
BP-2-25	0	0	0	0	9	0
BP-2-26	40	0	8	48	0	10
BP-2-27	1	24	0	25	0	20
BP-2-28	26	16	0	42	0	20
BP-2-29	6	8	0	14	0	0
BP-2-30	37	0	0	37	0	20
BP-2-31	34	9	0	43	11	30
BP-2-32	32	0	0	32	0	30
BP-2-33	0	0	0	0	2	0

BP-2-34	58	53	0	111	0	10
BP-2-35	55	0	1	56	8	10
BP-2-36	1	24	0	25	0	20
BP-2-37	14	0	0	14	0	20
BP-2-38	37	0	4	41	0	30
BP-2-39	1	6	0	7	0	10
BP-2-40	26	7	7	40	1	20
BP-2-41	13	7	4	24	0	20
BP-2-42	34	22	0	56	0	20
BP-2-43	13	7	0	20	0	20
BP-2-44	21	0	0	21	0	10
BP-2-45	19	3	0	22	1	0
BP-2-46	11	0	0	11	0	10
BP-2-47	8	9	0	17	0	20
BP-2-48	27	17	0	44	0	20
BP-2-49	17	0	5	22	0	10
BP-2-50	20	0	0	20	0	0
BP-2-51	10	1	0	11	0	10
BP-2-52	41	3	0	44	17	0
BP-2-53	12	0	0	12	0	0
BP-2-54	11	5	0	16	0	10
BP-2-55	16	0	0	16	0	20
BP-2-56	14	0	0	14	0	20
BP-2-57	18	0	0	18	0	20
BP-2-58	45	0	0	45	0	0
BP-2-59	57	0	0	57	0	21
BP-2-60	0	0	6	6	0	0
BP-2-61	21	13	10	44	0	30
BP-2-62	26	8	0	34	0	20
BP-2-63	10	10	2	22	0	10
BP-2-64	15	7	0	22	0	20
BP-2-65	7	35	9	51	0	20
BP-2-66	2	0	0	2	0	0
BP-2-67	18	20	2	40	0	0
BP-2-68	11	14	0	25	1	20
BP-2-69	24	6	6	36	0	10
BP-2-70	9	0	0	9	10	0
BP-2-71	8	10	0	18	0	10
BP-2-72	13	10	1	24	0	10
BP-2-73	21	0	0	21	0	10
BP-2-74	10	12	0	22	0	20

Es besteht keine Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und der Höhe der Anti-BP230 IgE Autoantikörper Im Serum der BP Patienten und kein Zusammenhang zwischen den Anti-BP230 IgE Autoantikörpern und dem Auftreten eines bestimmten klinischen Phänotyps.

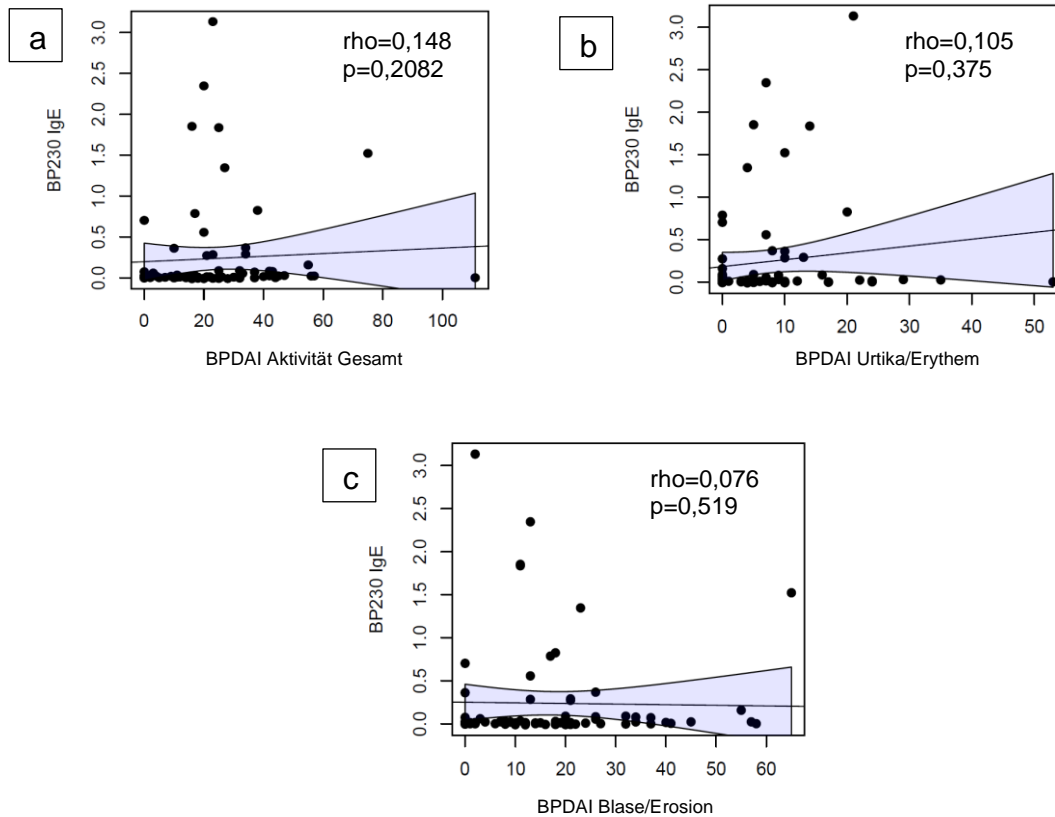


Abb. 11 Ergebnisse der Korrelationsanalysen

Grauer Bereich: Konfidenzintervall mit Ausgleichgrade. Zudem angegeben: rho- und p-Werte.

- a) X-Achse: Krankheitsaktivität (BPDAI), Y-Achse: Anti-BP230 IgE (OD)
- b) X-Achse: Urtika/Erytheme (BPDAI), Y-Achse: Anti-BP230 IgE (OD)
- c) X-Achse: Blasen/Erosionen (BPDAI), Y-Achse: Anti-BP230 IgE (OD)

Auf Abb.11a ist zu sehen, dass keine Korrelation (Spearman Correlation Test $\rho=0,148$, $p=0,2082$) zwischen der Krankheitsaktivität und der Höhe des Anti-BP230 IgE Antikörperspiegels besteht. Die Krankheitsaktivität wurde durch den BPDAI ermittelt, hierfür wurde der Wert für „Aktivität Blasen/Erosionen“ mit dem Wert für

„Aktivität Urtika/Erytheme/Andere“ addiert (siehe Abb.11). In Abb. 11 b ist dargestellt, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von urtikariellen/erythematösen Läsionen dem Anti-BP230 IgE Spiegel besteht (Spearman Correlation Test $\rho=0,105$, $p=0,375$). Die urtikariellen/erythematösen Läsionen wurden mittels BPDAl anhand des Wertes für „Aktivität Urtika/Erytheme/Andere“ ermittelt. Abb. 11c zeigt, dass keine Korrelation zwischen der Höhe der Anti-BP230 IgE Antikörpern und dem Auftreten von Blasen/Erosionen besteht (Spearman Correlation Test $\rho=0,076$, $p=0,519$). Das Auftreten von Blasen oder Erosionen wurde ebenfalls mittels BPDAl ermittelt, hier wurde die Kategorie „Aktivität Blasen/Erosionen“ aus dem BPDAl festgehalten.

Es zeigt sich eine schwache Korrelation zwischen der Höhe der Anti-BP230 IgE Antikörper Spiegel und dem Gesamt-IgE. Die Höhe der Anti-BP230 IgE Antikörper zum Zeitpunkt der Erstdiagnose korrelieren schwach positiv mit der Höhe des Gesamt-IgE Spiegels (Spearman Correlation Test $\rho=0,262$, $p=0,023$).

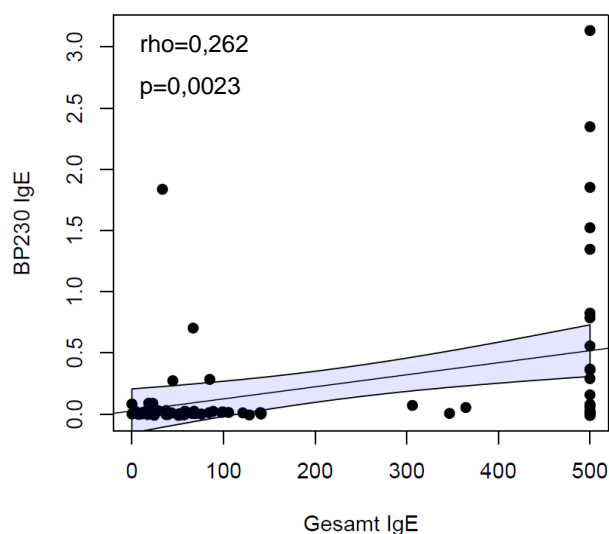


Abb. 12: Ergebnis der Korrelationsanalyse. X-Achse: Gesamt-IgE. Y-Achse: Anti-BP230 IgE (U/ml). Graue Bereich: Konfidenzintervall mit Ausgleichgrade. Zudem angegeben: rho- und p-Wert.

Eine weitere Korrelationsanalyse ließ keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Höhe der Anti-BP230 IgE Autoantikörper Spiegel und dem prozentualen Anteil der eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut (Spearman Correlation Test $\rho=0,106$, $p=0,369$) erkennen (Abb. 13).

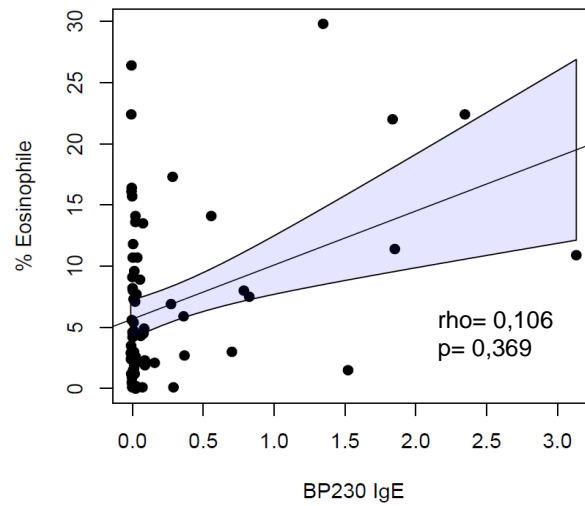


Abb. 13 Ergebnis der Korrelationsanalyse. X-Achse: Anti-BP230-IgE (U/ml), Y-Achse: eosinophilen Granulozyten im Blut (%). Grauer Bereich: Konfidenzintervall, mit Ausgleichgrade. Zudem angegeben: rho- und p-Wert.

Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Höhe der Anti-BP230 IgE und den Anti-BP230 IgG Autoantikörpern (siehe Abb. 14). Patienten mit Anti-BP230 IgE Autoantikörpern haben erhöhte Anti-BP230 IgG Antikörperspiegel (Spearman Correlation Test $\rho=0,385$ $p=0,001$).

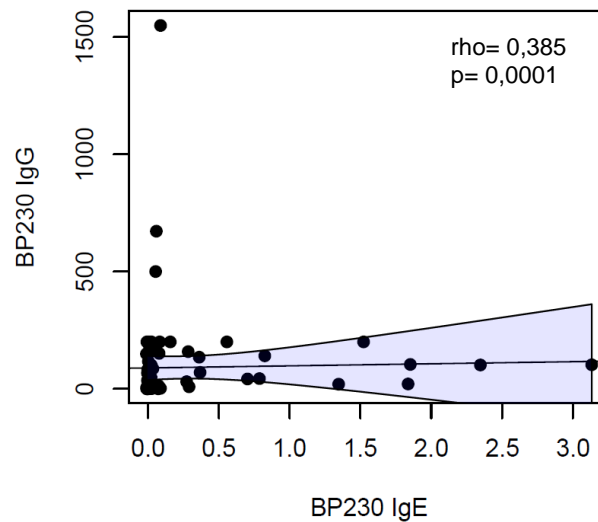


Abb. 14 Ergebnis der Korrelationsanalyse. X-Achse: Anti-BP230-IgE (U/ml), Y-Achse: Anti-Bp230 IgG (U/ml). Grauer Bereich: Konfidenzintervall, mit Ausgleichgrade. Zudem angegeben: rho- und p-Wert.

Es zeigt sich eine schwache Korrelation zwischen der Höhe der Anti-BP230 IgG Antikörper und der Krankheitsaktivität ($\rho=0,269$, $p=0,020$), dabei gibt es allerdings keine signifikante Korrelation zu dem Auftreten von Blasen/Erosionen ($\rho=0,157$, $p=0,183$) oder Urtikae/Erythemen ($\rho=0,214$, $p=0,067$) (siehe Abb. 15 a) -c)).

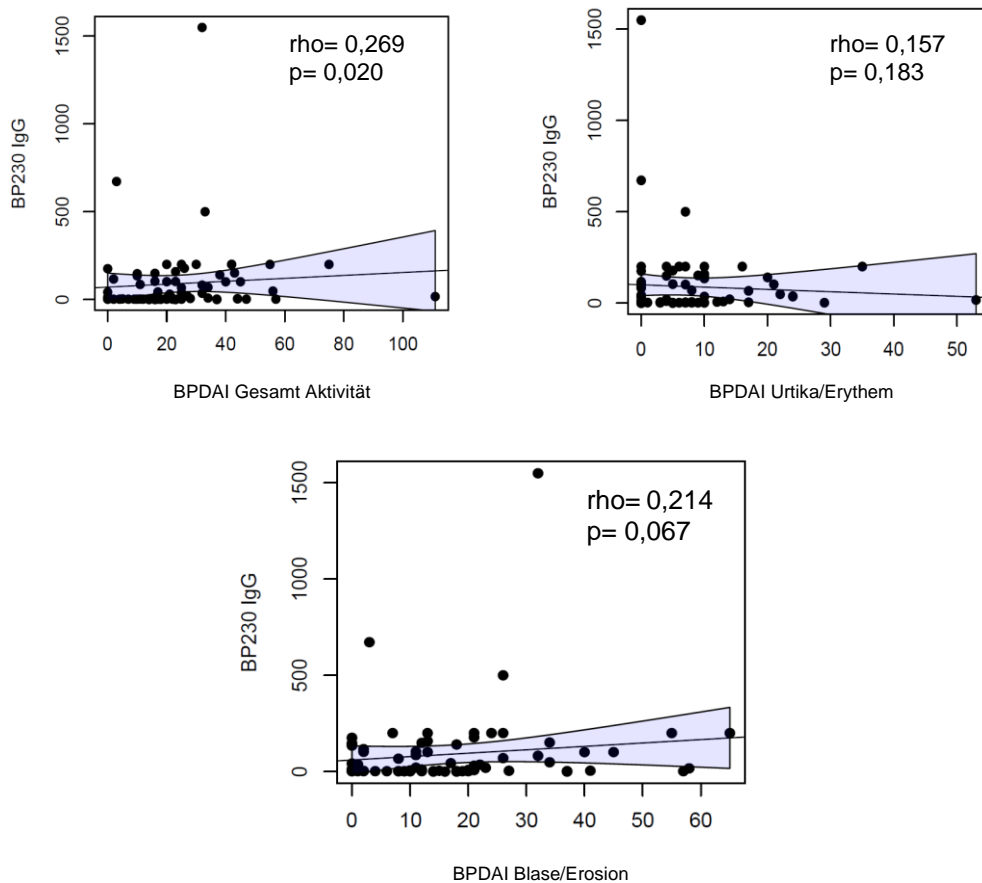


Abb. 15 Ergebnisse der Korrelationsanalysen

Grauer Bereich: Konfidenzintervall mit Ausgleichgrade. Zudem angegeben: rho- und p-Werte.

- X-Achse: Krankheitsaktivität (BPDAI), Y-Achse: Anti-BP230 IgG (U/ml)
- X-Achse: Urtika/Erytheme (BPDAI), Y-Achse: Anti-BP230 IgG (U/ml)
- X-Achse: Blasen/ Erosion (BPDAI), Y-Achse: Anti-BP230 IgG (U/ml)

Eine schwache Korrelation zeigte sich zwischen dem Auftreten von Anti-BP230 IgG Antikörpern und dem Auftreten von Anti-BP180 NC16A IgG Antikörpern ($\rho = 0,250$, $p = 0,033$).

Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass keine signifikante Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und der Höhe der Anti-BP180 IgE Antikörpern besteht ($\rho = -0,138$, $p = 0,241$), allerdings besteht eine schwache negative Korrelation zwischen dem Auftreten von Blasen und dem Vorhandensein von Anti-

BP180 NC16A IgE Autoantikörpern. Keine Korrelation besteht auch zwischen der Höhe der Anti-BP180 NC16A IgE Antikörpern und dem Auftreten von Urtikae/Erythemen ($\rho=1,44$, $p=0,222$). Es besteht weder ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Anti-BP180 NC16A IgE Antikörpern und dem Gesamt-IgE ($\rho=0,135$, $p=0,251$) noch der Zahl der Eosinophilen im peripheren Blut ($\rho=-0,066$, $p=0,575$). Auch ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Anti-BP180 NC16A IgE Antikörpern und der Höhe der Anti-BP180 NC16A IgG Antikörpern ($\rho=-0,028$, $p=0,814$) oder der Höhe der Anti-BP230 IgG Antikörper ($\rho=0,135$, $p=0,251$) besteht nicht.

Es besteht keine Korrelation zwischen den Anti-BP180 NC16A IgG Antikörpern und der Krankheitsaktivität ($\rho=0,001$, $p=0,992$). Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Anti-BP180 NC16A IgG Antikörpern und einem bestimmten klinischen Phänotyp besteht ebenfalls nicht ($\rho= -0.045$ bzw. 0.168 , $p= 0.704$ bzw. 0.156). Die Anti-BP180 NC16A IgG Antikörper korrelieren weder mit der Eosinophilie des Blutes ($\rho=0,156$, $p=0,187$) noch mit der Höhe des Gesamt-IgE ($\rho=-0,007$, $p=0,951$).

Weiterhin war zu konstatieren, dass keine Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil der Eosinophilen im peripheren Blut und der Intensität des Pruritus bestand, (rho=-0.036, p=0,760).

Tab. 10 Zusammenfassung der Ergebnisse der Korrelationsanalysen.

	Anti-BP230 IgE		Anti-BP230 IgG		Anti-BP180-IgE		Anti-BP180-IgG		Pruritus	
	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p
BPDAI gesamt	0,148	0,208	0,269	0,020	-0,138	0,241	0,001	0,992	0,398	0,0004
BPDAI Blase/ Erosion	0,076	0,519	0,157	0,183	-0,238	0,0413	-0,045	0,704	0,284	0,014
BPDAI Urtika/ Erythem	0,105	0,375	0,214	0,067	0,144	0,222	0,168	0,156	0,280	0,015
Pruritus	0,078	0,507	0,119	0,311	-0,084	0,472	-0,018	0,883	-----	-----
Eosinophile	0,135	0,252	0,042 (Absolut) 0,012 (Prozent)	0,723 (Absolut) 0,918 (Prozent)	-0,066	0,575	0,156	0,187	-0,036	0,760
Gesamt-IgE	0,262	0,024	0,257	0,027	0,135	0,251	-0,007	0,951	-0,020	0,869
Anti-BP180-IgE	0,107	0,362	-0,084	0,479	-----	-----	-0,028	0,814	-0,084	0,472
Anti-BP230 IgG	0,385	0,001	-----	-----	0,135	0,251	0,250	0,033	0,119	0,311
Anti-BP180 IgG	0,008	0,943	0,250	0,033	-0,028	0,814	-----	-----	-0,018	0,883

fettgedruckte p-Werte: Korrelation

4.3. Immunoblots

Tab.11: Ergebnisse der Immunoblots der Patienten mit BP (Kohorte 2)

Fragment \ Patient	N1	N2	R1	R2	C1	C2	C3	Anti-BP230 IgE ELISA
BP-35	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-39	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-41	-	-	-	-	-	+	+	+
BP-42	-	-	-	-	-	-	+	-
BP-43	-	-	-	-	-	+	+	+
BP-44	-	-	-	-	-	+	-	-
BP-45	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-46	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-47	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-48	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-49	-	-	-	-	-	-	+	+
BP-50	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-51	-	-	-	-	-	+	-	-
BP-52	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-53	-	-	-	-	-	+	+	-
BP-54	-	-	-	-	-	+	+	+
BP-56	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-57	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-58	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-59	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-60	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-61	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-62	-	-	-	-	-	+	+	+
BP-63	-	-	-	-	-	+	-	-
BP-64	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-65	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-66	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-67	-	-	-	-	-	-	+	+
BP-68	-	-	-	-	-	+	+	+
BP-69	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-70	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-71	-	-	-	-	-	-	-	-
BP-72	-	-	-	-	-	+	+	+
BP-73	-	-	-	-	-	-	-	+
BP-74	-	-	-	-	-	-	-	-
Summe	0	0	0	0	0	10	10	9

Um herauszufinden, ob es neben den im Anti-BP230 IgE ELISA verwendeten Fragment C3 noch andere immundominante Epitope in Bezug auf die IgE-Reaktivität gibt, führten wir Immunoblots mit 7 verschiedenen rekombinanten Fragmenten von

BP230 mit 34 Seren von BP Patienten, die bei Erstdiagnose entnommen wurden, durch. Als negative Kontrollen dienten 7 Seren von gesunden Blutspendern.

Zunächst wurde die Proteinmenge, mit der sich die Antikörper am besten darstellen lassen, ermittelt. Hierzu führten wir den Immunoblot mit Proteinmengen in aufsteigender Dosierung durch. Es stellte sich heraus, dass eine Proteinmenge von 40 µl pro Tasche die besten Ergebnisse liefert,

Bei zehn Seren ließen sich Autoantikörper gegen das Fragment C3 vom BP230 nachweisen, acht dieser Seren waren zuvor auch im BP230 IgE ELISA reaktiv. Es

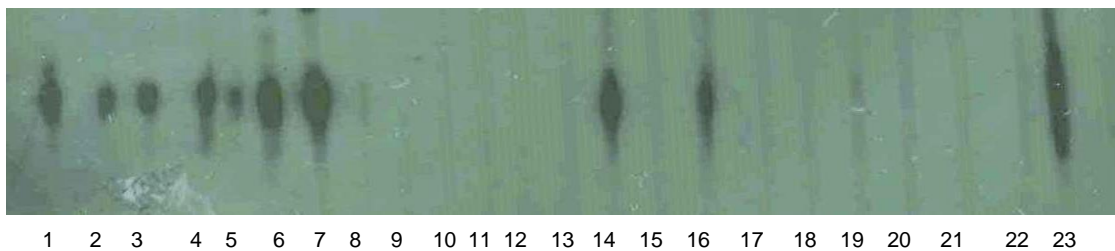


Abb. 16 Immunoblot mit Fragment C3 von BP230

Streifen 1-7, 14 und 16 stellen positive Patientenserum dar, Streifen 8-13 und 15 negative Patientenserum, Streifen 17-22 stellen die negativen Kontrollen mit normalem humanem Serum dar. 23 stellt die positive Kontrolle dar.

konnten durch den Immunoblot bei zwei Seren IgE Autoantikörper nachgewiesen werden, die im ELISA zuvor nicht nachweisbar waren. Bei dem einen Serum waren zuvor im ELISA jedoch IgG Antikörper gegen BP230 und BP180 NC16A nachweisbar. Das zweite Serum zeigte sich zuvor im Anti-BP180 NC16 A IgE ELISA

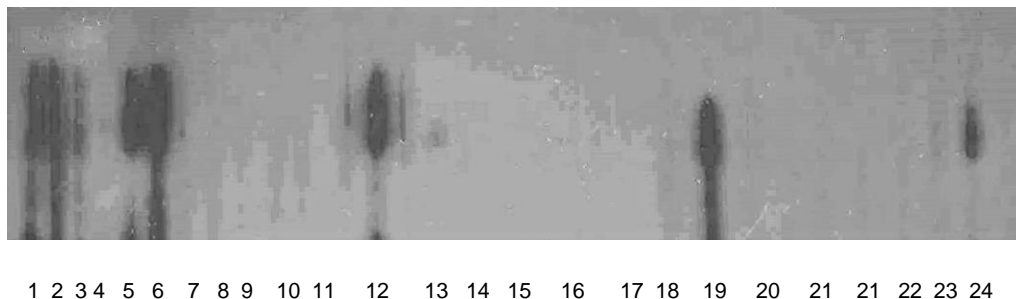


Abb. 17 Immunoblot mit Fragment C2 von BP230

Streifen 1-3, 5, 6, 12 und 19 stellen positive Patientenserum dar, Streifen 4, 7-11, 13-18 und 20-23 bilden die negativen Patientenserum ab und Streifen 7-11 stellt die Seren von negativen Kontrollen mit NHS dar.

positiv. Ein Serum, bei welchem im BP230 IgE ELISA Antikörper nachgewiesen werden konnten, war im Immunoblot negativ. Zudem ließen sich bei 10 Seren IgE Antikörper gegen das Fragment C2 des BP230 detektieren. Bei sieben Seren ließen sich im Immunoblot sowohl Antikörper gegen das Fragment C3, als auch gegen das Fragment C2 nachweisen, d.h. in 3 Seren konnte ausschließlich eine Reaktivität gegen das C2 Fragment detektiert werden. Bei einem dieser Seren konnten zuvor im ELISA weder IgE noch IgG Antikörper gegen BP180 NC16A oder BP230 gezeigt werden. Das zweite Serum zeigte im ELISA IgG und IgE Antikörper gegen BP230, sowie IgG Antikörper gegen BP180 NC16A. Das dritte Serum wies im ELISA nur IgG Antikörper gegen BP180 NC16A auf.

Gegen andere Fragmente des BP230 konnten in keinem der Seren IgE Autoantikörper nachgewiesen werden. Bei den gesunden Blutspendern konnten keine IgE-Autoantikörper gegen Fragmente von BP230 nachgewiesen werden.

5. Diskussion

Pemphigoiderkrankungen sind gekennzeichnet durch Autoantikörper gegen Strukturproteine der DEJ. Die bei weitem häufigste Pemphigoiderkrankung ist das BP, das immunpathologisch durch Autoantikörper gegen BP180 (Kollagen Typ XVII) und BP230 gekennzeichnet ist. IgG- und in geringerem Maße auch IgA-Autoantikörper sind die wichtigsten Autoantikörper-Isotypen bei dieser Erkrankung. Durch die Entwicklung von mehreren Mausmodellen und den erfolgreichen Einsatz von Omalizumab, einem Anti-IgE-Antikörper, in der Therapie des BP, wurde das Interesse an der pathophysiologischen Bedeutung der IgE-Antikörper in der bei dieser Erkrankung geweckt (Fairley et al., 2007; Yu et al., 2014; London et al., 2012; Schmidt & Zillikens, 2013; Lin et al., 2018; van Beek et al., 2016).

Das Ziel dieser Studie war es, einen Anti-BP230 IgE ELISA zu entwickeln und die Relevanz von IgE Antikörpern gegen BP230 in Bezug auf die Krankheitsaktivität zu untersuchen.

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt Seren von 367 Patienten untersucht. Neben dem neu entwickelten Anti-BP230 IgE ELISA kamen auch ein bereits etablierter Anti-BP180 NC16A IgE ELISA (van Beek et al., 2017b) und verschiedene kommerziell erhältliche ELISA, der Anti-BP180 NC16A IgG ELISA (Sitaru et al., 2007), der Anti-BP230 IgG ELISA (Blöcker et al., 2012) und der Gesamt-IgE ELISA zum Einsatz. Zusätzlich wurde bei 35 BP Seren ein Immunoblot mit verschiedenen Fragmenten des BP230 durchgeführt, um die IgE Reaktivität gegen ebendiese Fragmente zu überprüfen und die immundominate Region für die IgE Antikörper zu identifizieren.

Neben insgesamt 74 Seren von BP Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (Kohorte 2), wurden 80 Seren von konsekutiven BP Patienten (Kohorte 3), 37 Seren von MMP Patienten, 55 Seren von Patientinnen mit PG, 71 Seren von gesunden Müttern, die innerhalb von 24 Stunden nach Geburt entnommen wurden, und 50 Seren von Blutspender verwendet. Von sieben BP Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Anti-BP230 IgE Antikörper nachweisbar waren, wurden zudem je zwei weitere Seren, die im Verlauf der Erkrankung abgenommen wurden, untersucht.

Bei Kohorte 2 wurde zudem der BPDAl zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im weiteren Krankheitsverlauf erhoben. Für die im Folgenden beschriebenen Korrelationsanalysen wurde die Kohorte 2 der BP Patienten berücksichtigt. Bei Kohorte 1 und 3 lagen uns diese Daten nicht vor, da es sich um Material-Einsendungen aus externen dermatologischen Kliniken/Praxen handelte.

Im Vorfeld der vorliegenden Promotionsarbeit wurde in der Abteilung *Translation* des LIED bereits ein BP230 IgE ELISA auf Basis des kommerziellen Anti-BP230 IgG ELISA der Firma Euroimmun entwickelt. Als Zweitantikörper wurde der Anti-IgE-Antikörper ebendieser Firma verwendet. Es ergab sich mittels ROC-Analyse (Abb.7) eine Sensitivität zwischen 0,471 und 0,769, sowie eine Spezifität zwischen 0,971 und 1 jeweils in Abhängigkeit vom Gesamt-IgE. Für die ROC-Analyse wurden die 34 Seren von BP Patienten der Kohorte 1 und 105 Kontroll Seren verwendet. Auch Hashimoto et al gingen im Jahr 2017 in ähnlicher Weise vor, auch sie nahmen einen bereits erhältlichen Anti-BP230 IgG ELISA, um einen Anti-BP230 IgE ELISA zu entwickeln (Hashimoto et al., 2017).

Das mittlere Alter der Kohorte 2 lag bei 79 Jahren. Die Kohorte repräsentiert damit das Alter beschriebener BP Kohorten, bei denen das Durchschnittsalter zwischen 69 und 81 Jahren lag (Izumi et al., 2019; Kalińska-Bienias et al., 2019; Koderä et al., 2019; van Beek et al., 2017b). Mit einem Frauenanteil von 51,4 % waren beide Geschlechter ungefähr gleich häufig betroffen. In bereits veröffentlichten Studien zeigte sich ein Frauenanteil von 56,5 %, 60,7 %, 59,0% und 61% (Eftekhari et al., 2018; Joly et al., 2012; Langan et al., 2008; van Beek et al., 2017b).

Eine Beschreibung der Korrelation der Krankheitsaktivität anhand von Kohorte 2 wurde möglich, da bei den Patienten bei der Erstdiagnose und bei den weiteren Vorstellungen in der dermatologischen Abteilung des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Serum zur Bestimmung der Antikörper entnommen und der BPDAl erhoben wurde. So sind auch Aussagen über den Verlauf der Antikörpertiter in Bezug auf die Krankheitsaktivität möglich. Bei allen Patienten wurde die Diagnose im Vorfeld durch eine DIF, eine IIF auf humaner Spalthaut und/ oder mittels BP180 NC16A IgG ELISA gesichert (Schmidt et al., 2020).

Bei 13 (17,6%) der 74 Seren von BP Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (Kohorte 2) ließen sich Anti-BP230 IgE Autoantikörper nachweisen. Bei den

konsekutiven Patienten (Kohorte 3) war der Anteil mit 28,8% höher. Dies könnte darauf hindeuten, dass die IgE Autoantikörper gegen BP230 erst im Laufe der Erkrankung gebildet werden und nicht von Beginn an existieren.

In verschiedenen Studien lag der prozentuale Anteil der Anti-BP230 IgE positiven Seren zwischen 21 und 68% (Ishiura et al., 2008; Fania et al., 2012; Ghohestani et al., 1998; Delaporte et al., 1996). Die Unterschiede lassen sich durch die Abweichungen in den untersuchten Patientenkohorten und den nicht einheitlichen Testsystemen erklären. So bestehen beispielsweise Abweichungen in Sensitivität und Spezifität zwischen ELISA und Immunoblot-Systemen. Delaporte et al. verwendete im Jahr 1996 Radioimmunassays zum Nachweis von BP230 IgE Antikörpern, sie fanden bei 4 von 19 Seren (21,1%) IgE Autoantikörper gegen die C-terminale Domäne von BP230 (Delaporte et al., 1996).

Um ein einheitliches Testsystem zu entwickeln, muss also zunächst definiert werden, welches die immundominanten Domänen für die IgE Reaktivität bei BP230 sind. Mit diesem Ziel führten wir Immunoblots mit sieben verschiedenen Fragmenten von BP230 (siehe Abb.9) an 35 Seren von BP Patienten durch. Es zeigte sich, dass 10 von 35 getesteten (28,6%) Patientenseren Autoantikörper gegen das Fragment C3 aufwiesen; dieses Fragment wurde auch für den ELISA von Euroimmun verwendet. Im ELISA waren acht dieser Seren bereits positiv getestet worden, bei zwei Seren, die zuvor im ELISA negativ getestet worden sind, konnten durch den Immunoblot IgE Autoantikörper gegen das Fragment C3 vom BP230 detektiert werden. Ein Serum, welches zuvor im ELISA positiv für IgE Autoantikörper gegen das Fragment C3 vom BP230 getestet wurde, zeigte sich im Immunoblot negativ. Ebenfalls 10 Seren zeigten IgE-Autoantikörper gegen das Fragment C2 vom BP230, gegen andere Fragmente konnten keine IgE-Antikörper nachgewiesen werden. Bisher wurde in verschiedenen Studien das Vorkommen von Anti-BP230 IgE Autoantikörpern berichtet, allerdings wurde bisher keine immundominante Region für die IgE Reaktivität definiert (Ghohestani et al., 1998; Ishiura et al., 2008; Fania et al., 2012; Hashimoto et al., 2017).

Blöcker et al. konnten im Jahr 2012 mittels Westernblot nachweisen, dass das Fragment C3 die immundominante Region des BP230 für IgG Antikörper ist, aber auch gegen andere Fragmente des BP230 konnten IgG Antikörper nachgewiesen

werden (Blöcker et al., 2012). Im Jahr 2016 konnten Hayakawa et al. mittels neu entwickelter ELISA Systeme bestätigen, dass die meisten IgG Autoantikörper gegen C-terminale Fragmente von BP230 gerichtet sind (Hayakawa et al., 2016).

Weder bei Seren der Kohorte 2 (BP bei Erstdiagnose) noch bei Seren der Kohorte 3 (Konsekutive BP Patienten) konnten ausschließlich Anti-BP230 IgE Autoantikörper nachgewiesen werden. Dies lässt im ersten Moment darauf schließen, dass der neu etablierte ELISA diagnostisch keine Relevanz zu haben scheint. Allerdings handelt es sich bei den verwendeten Seren um Seren von Patienten mit gesichertem BP, das heißt bereits im Vorfeld waren nur bei 5 Patienten im ELISA weder IgG Antikörper gegen BP230 noch gegen BP180 nachweisbar.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, war es zu ermitteln, inwieweit die Höhe der BP230 IgE Autoantikörper mit der Krankheitsaktivität korreliert. Es zeigte sich allerdings keine Korrelation zwischen der Höhe von Anti-BP230 IgE Antikörpern und der Krankheitsaktivität. Im Einklang damit konnten auch Hashimoto et al im Jahr 2017 keinen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Anti-BP230 IgE Autoantikörpern und der Krankheitsaktivität feststellen. Sie verwendeten jedoch zur Beschreibung der Krankheitsaktivität nicht den BPDAl, sondern ein selbst entwickeltes Klassifikationssystem. In dieses flossen neben der klinischen Ausprägung der Erkrankung auch der Einsatz von systemischen Kortikosteroiden mit ein (Hashimoto et al., 2017), wohingegen Delaporte et al berichteten, dass Patienten mit spezifischen IgE Autoantikörpern gegen BP230 unter einem schwereren Verlauf der Erkrankung litten. Delaporte et al. verwendeten allerdings ein anderes 55 kDa schweres Fragment der c-terminalen Region des BP230 und zudem keinen ELISA sondern ein Radioimmunassay (Delaporte et al., 1996).

Bei der Untersuchung der Verlaufsseren fiel auf, dass eine intraindividuelle Korrelation der Anti-BP230 IgE Antikörper mit der Krankheitsaktivität besteht (Approximative Spearman Correlation Test $p=0,013$). Ein ähnliches Ergebnis zeigte eine Studie von Cozzani et al. an Seren von zwei BP Patienten (Cozzani et al., 1997).

Neben dem Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und der Höhe der Anti-BP230 IgE Autoantikörper, war Ziel der vorliegenden Arbeit zu analysieren, ob

ein bestimmter Phänotyp des BP mit dem Auftreten von BP230 IgE Autoantikörpern vergesellschaftet ist. In den Korrelationsanalysen zeigt sich, dass das Auftreten von Anti-BP230 IgE Autoantikörpern nicht mit dem vermehrten Auftreten von urtikariellen oder erythematösen Läsionen assoziiert war. Ähnliche oder kontroverse Ergebnisse wurden für die Anti-BP230 IgE Antikörper in der Literatur nicht beschrieben. Allerdings beschrieben van Beek et al im Jahr 2017, dass auch zwischen dem Vorkommen von Anti-BP180 NC16A IgE Antikörpern und dem Auftreten von urtikariellen oder erythematösen Läsionen kein signifikanter Zusammenhang besteht (van Beek et al., 2017b). Es zeigte sich, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Blasen oder Erosionen und dem Nachweis von Anti-BP230 IgE Antikörpern besteht. Für die Anti-BP230 IgE Autoantikörper wurde bisher in der Literatur kein Zusammenhang zu dem Auftreten von Blasen oder Erosionen beschrieben. Van Beek et al. konnten nachweisen, dass auch zwischen der Höhe der Anti-BP180 NC16A IgE Autoantikörpertiter und dem Auftreten von Blasen/Erosionen bei BP Patienten kein signifikanter Zusammenhang besteht (van Beek et al., 2017b). Im Jahr 2017 berichteten Hashimoto et al, dass der noduläre Phänotyp bei BP Patienten positiv mit den Anti-BP230 IgE und negativ mit den Anti-BP180 IgE Autoantikörpern korreliert (Hashimoto et al., 2017). Da sich der noduläre Typ des BP nicht durch den BPDAI ermitteln lässt, lässt sich anhand der vorliegenden Daten der Patienten aus Kohorte 2 keine Aussage hierzu treffen. Auch intraindividuell korrelieren die Anti-BP230 IgE Antikörper nicht mit dem Auftreten von Blasen/Erosionen oder erythematösen/urtikariellen Läsionen. Es lässt sich also zusammenfassend sagen, dass das Auftreten von Anti-BP230 IgE Autoantikörpern mit keinem durch den BPDAI bestimmten Phänotyp der Erkrankung assoziiert zu sein scheint.

Des Weiteren ließ sich bei BP Patienten mit nachweisbaren Anti-BP230 IgE Antikörpern keine verstärkte Eosinophilie des Blutes nachweisen. Im Gegensatz dazu stellten Engineer et al. im Jahr 2001 fest, dass die sechs von ihnen untersuchten BP Patienten, die alle sowohl im Serum, als auch in der Blasenflüssigkeit IgE Autoantikörper gegen BP230 aufwiesen, eine Eosinophilie im Serum und in der Haut zeigten (Engineer et al., 2001). Engineer et al. untersuchten jedoch anders als in der vorliegenden Arbeit keine Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, sondern Patienten im aktiven Krankheitsstadium und mit

prologiertem Krankheitsverlauf (Engineer et al., 2001). Zudem untersuchten Engineer et al. mit sechs Patienten nur eine kleine Kohorte (Engineer et al., 2001). Auch Ishiura et al. konnten im Jahr 2008 zeigen, dass die Höhe der Anti-BP230 IgE Antikörper positiv mit der Akkumulation von eosinophilen Zellen in der Haut von Patienten korreliert (Ishiura et al., 2008).

Es zeigte sich, dass die Höhe der Anti-BP230 IgE Antikörper positiv mit der Höhe des Gesamt-IgE korreliert. Bereits im Jahr 1998 konnten Ghohestani et al. den gleichen Zusammenhang feststellen (Ghohestani et al., 1998). Messingham et al. zeigten im Jahr 2014 in Ergänzung hierzu, dass auch zwischen den Anti-BP180 IgE Antikörpern und dem Gesamt-IgE eine positive Korrelation besteht, sie untersuchten hierfür 49 Seren von BP Patienten, die noch keine spezifische Therapie erhalten hatten, zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch van Beek et al. (Messingham et al., 2014; van Beek et al., 2017b).

Der Immunoblot mit verschiedenen Fragmenten von BP230 zeigte, dass in 10 von 34 BP-Seren IgE Antikörper gegen das Fragment C3 vom BP230 nachweisbar waren. Dieses Fragment wird auch für den kommerziell erhältlichen Anti-BP230 IgG ELISA verwendet, welchen wir in abgewandelter Form für den neu entwickelten Anti-BP230 IgE ELISA verwendet haben. In 10 Seren waren IgE Antikörper gegen das Fragment C2 des BP230 nachweisbar, 3 dieser Seren wiesen zuvor kein IgE gegen BP230 im ELISA nach. Bei einem Serum waren weder IgE noch IgG Antikörper gegen BP230 und BP180 NC16A nachweisbar. Man kann also vermuten, dass die Durchführung des IgE Immunoblot mit Fragment C2 für einige Patienten einen zusätzlichen diagnostischen Nutzen haben könnte. Wenn beispielsweise der starke klinische Verdacht eines BP besteht, aber zuvor in den gängigen ELISA keine spezifischen Antikörper nachweisbar waren.

Neben den Anti-BP230 IgE Antikörpern konnten in der Kohorte 2 auch Anti-BP180 NC16A IgE Autoantikörper in 16 von 74 BP Seren (40%) nachgewiesen werden, in der Kohorte 3 lag der Wert bei 38,8%. Beide Werte sind im Einklang zu den im Jahr 2017 von van Beek et al. veröffentlichten Ergebnissen. In dieser Untersuchung war bei 40,2% der BP Seren IgE-Autoantikörper gegen BP180 NC16A nachweisbar (van Beek et al., 2017b). In anderen bisher veröffentlichten Studien lag der Anteil der für Anti-BP180 IgE positiven Seren mit bis zu 88,3% teils deutlich höher (Kalowska et

al., 2016; Dresow et al., 2009; van Beek et al., 2017b). Die sehr unterschiedlichen Ergebnisse in den Studien kamen vermutlich durch unterschiedliche Testsysteme zustande. Es wurde bisher kein kommerzieller Anti-BP180 IgE ELISA entwickelt.

Anti-BP230 IgG Antikörper ließen sich bei 36 der 74 (48,7%) Seren von BP Patienten der Kohorte 2 und bei 47 von 80 (58,8%) BP Patienten der Kohorte 3 nachweisen. In bisher veröffentlichten Studien lag der prozentuale Anteil der BP Seren mit Anti-BP230 IgG Antikörpern zwischen 50-70% (Blöcker et al., 2012; Charneux et al., 2011; Kromminga et al., 2004; Roussel et al., 2011; Yoshida et al., 2006). In verschiedenen Korrelationsanalysen berichteten lediglich Chanprapaph et al. von einer Korrelation der Anti-BP230 IgG Antikörper mit der Krankheitsaktivität (Chanprapaph et al., 2019). Wie auch andere Studien (Lee et al., 2012; Daneshpazhooh, 2018; Kromminga et al., 2004; Ishiura et al., 2008) konnten wir nicht feststellen, dass die Anti-BP230 IgG Antikörper intraindividuell mit der Krankheitsaktivität korreliert. Daraus lässt sich schließen, dass diese Antikörper sich nicht dazu eignen, das Therapieansprechen zu beurteilen.

In der Testung mit dem Anti-BP180 NC16A IgG ELISA waren 60 von 74 BP Seren von Patienten der Kohorte 2 positiv, was einem prozentualen Anteil von 81% entspricht. Bei den Seren der Kohorte 3 zeigten 74% eine IgG Reaktivität gegen BP180 NC16A. Die Ergebnisse liegen etwas unterhalb der Ergebnisse von in den letzten Jahren veröffentlichten Studien, in denen sich der prozentuale Anteil der BP180 NC16A IgG positiven Seren zwischen 82-93% bewegte (Sakuma-Oyama et al., 2004; Sitaru et al., 2007; Adaszewska et al., 2019; Holtsche et al., 2018). Eine Erklärung für die deutlichere Abweichung bei Kohorte 3 könnte in den unterschiedlichen Entnahme Zeitpunkten der Seren liegen. Da in Kohorte 3 konsekutive BP Patienten untersucht wurden, besteht die Möglichkeit, dass einige Patienten bereits eine wirksame Therapie erhalten haben und die Antikörper zu Zeitpunkt der Blutentnahme für die vorliegende Studie nicht mehr nachweisbar waren. Wohingegen Holtsche et al., Sakuma-Oyama et al. und Sitaru et al. Patienten vor Einleitung der Therapie untersuchten (Holtsche et al., 2018; Sitaru et al., 2007; Sakuma-Oyama et al., 2004).

In verschiedenen Studien wurde bereits die Bedeutung der Anti-BP 180 NC16A IgG Autoantikörper in der Krankheitsentstehung des BP belegt (Liu et al., 1993; Nishie

et al., 2007; Schmidt et al., 2000b). Zudem wurde die intraindividuelle Korrelation der Anti-BP180 NC16A IgG Antikörper mit der Krankheitsaktivität schon mehrfach beschrieben (Schmidt et al., 2000a; Amo et al., 2001; Chanprapaph et al., 2019; Feng et al., 2008; Cai et al., 2015). Bei der interindividuellen Korrelation der Anti-BP180 NC16A IgG Autoantikörper fallen die Studien allerdings nicht einheitlich aus. Während Holtsche et al im Jahr 2018 eine interindividuelle Korrelation der Krankheitsaktivität mit der Höhe der Anti-BP180 NC16A IgG Antikörper bei 253 therapienaiven Patienten nachwies (Holtsche et al., 2018), konnten Kamata et al. im Jahr 2019 keine Korrelation der Anti-BP180 NC16A IgG Antikörper mit der Krankheitsaktivität zeigen (Kamata et al., 2019). Auch wir konnten bei unserer Kohorte 2 keine Korrelation der Anti-BP180 NC16A IgG Antikörper mit der Krankheitsaktivität zum Zeitpunkt der Erstdiagnose feststellen. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse stellt die Datenerhebung bezüglich der Krankheitsaktivität dar. So verwendeten Holtsche et al., im Gegensatz zu Kamata et al. und der vorliegenden Arbeit, nicht den BPDAI zur Beschreibung der Krankheitsaktivität, sondern teilten die Patienten anhand der vorhandenen Blasen in eine milde Krankheitsaktivität bei <10 Blasen, in eine moderate Krankheitsaktivität bei 10-30 Blasen und in eine hohe Krankheitsaktivität bei >30 Blasen ein (Holtsche et al., 2018; Kamata et al., 2019).

Ob der Nachweis von Anti-BP180 IgG Antikörper mit einem bestimmten Phänotyp des BP assoziiert ist, wird in verschiedenen Studien unterschiedlich beschrieben. Während van Beek et al. im Jahr 2017 eine Korrelation zwischen dem Nachweis von Anti-BP180 IgG Antikörpern und dem Auftreten von Erosionen und Blasen zeigten (van Beek et al., 2017b), konnten Kamata et al. 2019 keinen Zusammenhang zwischen einem bestimmten Phänotyp und dem Auftreten von Anti-BP180 NC16A IgG Antikörpern nachweisen (Kamata et al., 2019). Auch wir konnten nachweisen, dass Anti-BP180 IgG Antikörper nicht mit einem bestimmten Phänotyp assoziiert sind.

Wir konnten zeigen, dass eine Korrelation zwischen der Höhe der Anti-BP180 NC16A IgG Antikörpern und den Anti-BP230 IgG Antikörpern besteht. Diese Beobachtung machten auch Chanprapaph et al. im Jahr 2019 (Chanprapaph et al., 2019).

Bei 46% der BP Patienten der Kohorte 2 zeigte sich ein erhöhtes Gesamt-IgE (>100 U/ml), bei Kohorte 3 war das Gesamt-IgE bei 54% der Seren erhöht. Diese Werte liegen unter den in anderen Studien veröffentlichten Werten, die sich zwischen 70% und 85% bewegten (van Beek et al., 2016). Dies mag mit unterschiedlichen Testsystemen oder unterschiedlichen Lagerbedingungen und -zeiten der Seren zusammenhängen. Auch die Heterogenität der untersuchten Patientengruppen könnte eine Rolle spielen. Während in unserer Untersuchung Patienten getestet wurden, bei denen das bullöse Pemphigoid erst kürzlich diagnostiziert wurde, waren bei anderen Untersuchungen sowohl Patienten bei Erstdiagnose als auch Patienten unter Therapie beteiligt. Bereits im Jahr 1974 berichteten Arbesmann et al. über das vermehrte Vorkommen erhöhter Gesamt-IgE Spiegel bei Patienten mit BP, zudem stellen sie fest, dass Pemphiguspatienten keine erhöhten Gesamt-IgE aufwiesen (Arbesman et al., 1974).

33 der 74 BP Patienten (45%) wiesen eine Eosinophilie im peripheren Blut auf. Höhere Spiegel an eosinophilen Granulozyten im Blut waren bei unserer BP Patienten Kohorte jedoch nicht mit einer erhöhten Krankheitsaktivität assoziiert. Bereits 1983 konnten Bushkell et al. in einer retrospektiven Studie mit 28 BP Patienten feststellen, dass 50% dieser Patienten eine Eosinophilie im peripheren Blut aufwiesen (Bushkell & Jordon, 1983). Im Jahr 2017 konnten de Grauw et al. in einem humanem ex vivo Modell nachweisen, dass eosinophile Granulozyten, die durch IL-5 aktiviert wurden in Anwesenheit von BP-Autoantikörpern eine Blasenbildung induzieren (Grauw et al., 2017). Erst kürzlich konnten Hashimoto et al. eine signifikante positive Korrelation zwischen der Stärke des Juckreizes und der Zahl der Eosinophilen im Blut von BP Patienten feststellen (Hashimoto et al., 2019). Diese Beobachtung ließ sich in unserer Kohorte 2 nicht bestätigen.

In Kohorte 2 zeigte sich eine Korrelation zwischen der Stärke der Pruritus und der Gesamt Aktivität ermittelt anhand des BPDAI ($p=0,0004$, $\rho=0,398$).

Da es sich in diesem Fall um eine monozentrische Kohorte handelt, können nur bedingt Aussagen zur allgemeinen Gültigkeit der Ergebnisse getroffen werden.

Zum ersten Mal wurden Seren von Patientinnen mit PG mit einem ELISA auf das Vorhandensein von BP230 IgE Autoantikörpern untersucht, in keinem Serum ließen sich ebendiese Autoantikörper nachweisen. Auch IgG Antikörper gegen BP230

ließen sich bei keinem der Seren nachweisen. Im Gegensatz dazu konnten Tnij et al im Jahr 2014 bei 4 von 25 PG Seren (16%) IgG Antikörper gegen BP230 nachweisen (Tani et al., 2015). In 41,8% unserer PG Seren zeigte sich ein erhöhtes Gesamt-IgE. Bisher wurde nur in Einzelfällen über erhöhte IgE Spiegel bei PG Patientinnen berichtet, so konnten Bonifazi et al bereits im Jahr 1984 bei einer Mutter mit PG erhöhte IgE Spiegel nachweisen, nicht jedoch bei dem Neugeborenen (Bonifazi & Meneghini, 1984). Wir konnten bei 35 von 55 Seren (64%) IgG Antikörper gegen BP180 NC16A nachweisen, in zuvor veröffentlichten Studien lag der prozentuale Anteil der Seren mit IgG Reaktivität gegen BP180 NC16A bei 60, 87 und 90% (Sitaru et al., 2004; Di Zenzo et al., 2007; Cobo et al., 2009). IgE Antikörper gegen BP180 NC16A waren in 5 von 40 Seren (12,5%) nachweisbar, bisher wurde das Vorkommen dieser Antikörper bei PG Patientinnen nur vereinzelt beschrieben (Chapman MA, Olague-Marchan M, Yancey KB, Giudice GJ, Fairley JA, 2007).

Bei keinem der Seren von Müttern, welches innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt abgenommen wurde, konnten IgE oder IgG Antikörper gegen BP230 oder BP180 NC16A nachgewiesen werden. Im Jahr 2010 untersuchten Noe et al Seren von 299 Schwangeren und 134 Nicht-Schwangeren Kontrollen auf das Vorkommen von Anti-BP180 NC16A IgE Autoantikörpern, bei den Schwangeren konnten die Antikörper in 7,7% der Seren nachgewiesen werden, wohin gegen IgG Antikörper gegen die NC16A Domäne von BP180 nicht nachgewiesen werden konnten. Bei den Kontrollseren waren nur in 2,2% der Seren IgE-Autoantikörper gegen BP180 NC16A nachweisbar (Noe et al., 2010). Über das Vorkommen von Antikörpern gegen BP230 bei schwangeren Frauen wurde bisher nicht berichtet.

Auch bei Patienten mit SHP wurde der Anti-BP230 IgE ELISA erstmalig durchgeführt. Bei keinem der Seren fiel der ELISA positiv aus. In 5 der 37 Seren (13,5%) ließen sich IgG Antikörper gegen BP230 nachweisen. In einzelnen publizierten Fallberichten wurde bereits über Vorhandensein von Anti-BP230 IgG Autoantikörper bei Patienten mit SHP berichtet (Inoue et al., 2016; Fukuchi et al., 2013). IgG Antikörper gegen BP180 NC16A konnten bei 18 Seren (24,3%) nachgewiesen werden, bereits im Jahr 1996 fanden Balding et al heraus, dass der überwiegende Teil der SHP Patienten IgG Antikörper gegen BP180 bilden, wobei sie feststellten, dass ungefähr 60% der Patientenserum mit einer Domäne des C-

terminalen Endes des BP180 reagieren (Balding et al., 1996). Auch in anderen Studien konnten gezeigt werden, dass 50-70% der SHP Seren mit Domänen des c-terminalen Endes von BP180 reagieren (Lee et al., 2003; Nie & Hashimoto, 1999; Schmidt et al., 2001). 27,0% der SHP Patienten konnten wir ein erhöhtes Gesamt-IgE feststellen. Bisher ist nur wenig über die Bedeutung von IgE-Antikörpern bei der Entstehung des SHP bekannt. Yayli et al konnten im Jahr 2011 mittels direkter Immunfluoreszenz bei 9 von 13 (69%) SHP Patienten IgE Ablagerungen entlang der Basalmembran feststellen, allerdings konnten sie keine Verbindung zu dem klinischen Erscheinungsbild herstellen (Yayli et al., 2011).

Lediglich bei jeweils einem der Seren von Patienten mit PV konnte ich IgE-oder IgG Autoantikörper gegen BP230 oder BP180 nachweisen. Der Anti-BP230 IgE ELISA wurde auch hier das erste Mal durchgeführt. Zudem konnten wir bei nur zwei von 40 PV Patienten (5,0%) ein erhöhtes Gesamt-IgE nachweisen. Im Jahr 1974 wurde wie bereits erwähnt zum ersten Mal darüber berichtet, dass erhöhte Gesamt-IgE Spiegel bei BP Patienten, aber nicht bei PV Patienten vorkommen (Arbesman et al., 1974). Nagel et al konnten allerdings bei 37 Patienten mit akutem PV zeigen, dass sowohl das Gesamt-IgE also auch die IgE Antikörper gegen Desmoglein 3 mit der Krankheitsaktivität korrelieren (Nagel et al., 2010).

Abschließend konnten wir in der vorliegenden Studie keine diagnostische Relevanz für den Anti-BP-230 IgE ELISA bei Patienten mit bereits gesichertem BP nachweisen, allerdings kann die Untersuchung auf Anti-BP230 IgE einen Nutzen bei Patienten mit Verdacht auf ein BP ohne den Nachweis von IgG Antikörper gegen BP180 oder BP230 haben. Eine Korrelation der Anti-BP230 IgE Spiegel mit der Krankheitsaktivität konnte nicht generell nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch eine intraindividuelle Korrelation der Anti-BP230 IgE Spiegel mit der Krankheitsaktivität in der Verlaufsbeobachtung. Es scheint also für einzelne Patienten sinnvoll zu sein, die Anti-BP230 IgE Antikörper zu bestimmen, bei Positivität im Krankheitsverlauf zu monitorieren und über die Anpassung der Therapie auf eine zielgerichtete anti-IgE Therapie nachzudenken. Es sind weitere Studien erforderlich, die die Ansprechrate von Patienten mit Anti-BP230 IgE Antikörpern auf die gegen IgE gerichteten Therapieoptionen untersuchen (z.B. Omalizumab.).

6. Zusammenfassung

Das bullöse Pemphigoid (BP) ist die in Mitteleuropa am häufigsten auftretende blasenbildende Autoimmundermatose. Sie betrifft vor allem ältere Patienten und ist mit starkem Juckreiz vergesellschaftet. Charakteristisch sind vor allem IgG Autoantikörper gegen zwei Strukturproteine der dermato-epidermalen Junktionszone, BP180 und BP230. Beim BP180 wurde vor allem der nicht-kollagenöse NC16A Anteil als immundominante Region beschrieben. Neben IgG Autoantikörpern wurden bei einigen Patienten auch über IgA und IgE Autoantikörper berichtet. Die linearen Antikörper-Ablagerungen an der dermato-epidermalen Junktionszone können mittels direkter Immunfluoreszenz, die zirkulierenden Autoantikörper mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF) oder Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), unter Verwendung rekombinanter Fragmente von BP180 und BP230, nachgewiesen werden. Während für den Nachweis von IgG gegen BP180 und BP230 kommerzielle ELISA verfügbar sind, trifft dies für IgE Antikörper nicht zu. In der Arbeitsgruppe wurde bereits ein experimenteller Anti-BP180 IgE ELISA etabliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels eines kürzlich entwickelten BP230 IgE ELISA die diagnostische Relevanz dieser Antikörper sowie die Korrelation mit der Krankheitsaktivität bei Patienten mit BP analysiert. Den Untersuchungen lagen zwei Kohorten mit insgesamt 154 BP Patienten zugrunde. Zur Bewertung der Krankheitsaktivität wurde der Bullous Pemphigoid Disease Area Index (BPDAI) verwendet, mit dem sich neben der Krankheitsaktivität auch der Phänotyp ermitteln lässt.

Anti-BP230 IgE Antikörper konnten bei 36 von 154 (23 %) BP Patienten nachgewiesen werden. Es zeigte sich weder ein Zusammenhang mit einem bestimmten Phänotyp noch eine Korrelation der Krankheitsaktivität mit den Anti-BP230 IgE Antikörpern bei Erstdiagnose. Allerdings konnten wir nachweisen, dass intraindividuell die Anti-BP230 IgE Antikörper mit der Krankheitsaktivität korreliert. Es zeigte sich zudem ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Anti-BP230 IgE Antikörpern und erhöhten Gesamt-IgE-Spiegeln.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit mittels Immunoblot eruiert werden, dass die Fragmente C2 und C3 die für die IgE Antikörper immundominate Regionen des BP230 sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Höhe der Anti-BP230 IgE Antikörper im Krankheitsverlauf ein Parameter zur Beurteilung des Therapieansprechens bei BP Patienten sein kann. Zudem könnte die Detektion von Anti-BP230 IgE Autoantikörpern auf ein besseres Ansprechen der BP Patienten auf gegen IgE gerichtete Therapien hinweisen, beispielweise Omalizumab. Um diese Vermutung zu bestätigen sind weitere multizentrische, prospektive klinische Studien notwendig.

7. Literaturverzeichnis

- Adaszewska, A., Kalińska-Bienias, A., Jagielski, P., Woźniak, K., & Kowalewski, C. (2019). The use of BIOCHIP mosaics in diagnostics of bullous pemphigoid: Evaluation and comparison to conventional multistep procedures. *Journal of cutaneous pathology*.
- Alpsoy, E., Akman-Karakas, A., & Uzun, S. (2015). Geographic variations in epidemiology of two autoimmune bullous diseases: pemphigus and bullous pemphigoid. *Archives of dermatological research*, 307(4), 291–298.
- Amagai, M., Ikeda, S., Hashimoto, T., Mizuashi, M., Fujisawa, A., Ihn, H., Matsuzaki, Y., Ohtsuka, M., Fujiwara, H., Furuta, J., Tago, O., Yamagami, J., Tanikawa, A., Uhara, H., Morita, A., Nakanishi, G., Tani, M., Aoyama, Y., Makino, E., Muto, M., Manabe, M., Konno, T., Murata, S., Izaki, S., Watanabe, H., Yamaguchi, Y., Matsukura, S., Seishima, M., Habe, K., Yoshida, Y., Kaneko, S., Shindo, H., Nakajima, K., Kanekura, T., Takahashi, K., Kitajima, Y., & Hashimoto, K. (2017). A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for bullous pemphigoid. *Journal of dermatological science*, 85(2), 77–84.
- Amber, K. T., Maglie, R., Solimani, F., Eming, R., & Hertl, M. (2018). Targeted Therapies for Autoimmune Bullous Diseases: Current Status. *Drugs*, 78(15), 1527–1548.
- Amo, Y., Ohkawa, T., Tatsuta, M., Hamada, Y., Fujimura, T., Katsuoka, K., & Hashimoto, T. (2001). Clinical significance of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *Journal of dermatological science*, 26(1), 14–18.
- Arai, M., Shirakawa, J., Konishi, H., Sagawa, N., & Terauchi, Y. (2018). Bullous Pemphigoid and Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitors: A Disproportionality Analysis Based on the Japanese Adverse Drug Event Report Database. *Diabetes care*, 41(9), e130-e132.
- Arbesman, C. E., Wypych, J. I., Reisman, R. E., & Beutner, E. H. (1974). IgE levels in sera of patients with pemphigus or bullous pemphigoid. *Archives of dermatology*, 110(3), 378–381.
- Atzmony, L., Mimouni, I., Reiter, O., Leshem, Y. A., Taha, O., Gdalevich, M., Hodak, E., & Mimouni, D. (2017). Association of bullous pemphigoid with malignancy: A

- systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 77(4), 691–699.
- Balding, S. D., Prost, C., Diaz, L. A., Bernard, P., Bedane, C., Aberdam, D., & Giudice, G. J. (1996). Cicatricial pemphigoid autoantibodies react with multiple sites on the BP180 extracellular domain. *The Journal of investigative dermatology*, 106(1), 141–146.
- Belfield, K. D., & Tichy, E. M. (2018). Review and drug therapy implications of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *American journal of health-system pharmacy AJHP official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 75(3), 97–104.
- Benzaquen, M., Borradori, L., Berbis, P., Cazzaniga, S., Valero, R., Richard, M.-A., & Feldmeyer, L. (2018). Dipeptidyl peptidase IV inhibitors, a risk factor for bullous pemphigoid: Retrospective multicenter case-control study from France and Switzerland. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 78(6), 1090–1096.
- Bertram, F., Bröcker, E.-B., Zillikens, D., & Schmidt, E. (2009). Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology JDDG*, 7(5), 434–440.
- Bing, L., Xiping, Z., Li, L., Jun, P., Yi-Xia, W., Min, Y., Qing, L., Qiu-Ning, S., Hong-Zhong, J., & Ya-Gang, Z. (2015). Levels of anti-BP180 NC16A IgE do not correlate with severity of disease in the early stages of bullous pemphigoid. *Archives of dermatological research*, 307(9), 849–854.
- Blöcker, I. M., Dähnrich, C., Probst, C., Komorowski, L., Saschenbrecker, S., Schlumberger, W., Stöcker, W., Zillikens, D., & Schmidt, E. (2012). Epitope mapping of BP230 leading to a novel enzyme-linked immunosorbent assay for autoantibodies in bullous pemphigoid. *The British journal of dermatology*, 166(5), 964–970.
- Bonifazi, E., & Meneghini, C. L. (1984). Herpes gestationis with transient bullous lesions in the newborn. *Pediatric dermatology*, 1(3), 215–218.
- Bushkell, L. L., & Jordon, R. E. (1983). Bullous pemphigoid: a cause of peripheral blood eosinophilia. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 8(5), 648–651.

- Cai, S. C. S., Allen, J. C., Lim, Y. L., Tan, S. H., & Tang, M. B. Y. (2015). Association of Bullous Pemphigoid and Malignant Neoplasms. *JAMA dermatology*, 151(6), 665–667.
- Chakievska, L., Holtsche, M. M., Künstner, A., Goletz, S., Petersen, B.-S., Thaci, D., Ibrahim, S. M., Ludwig, R. J., Franke, A., Sadik, C. D., Zillikens, D., Hölscher, C., Busch, H., & Schmidt, E. (2019). IL-17A is functionally relevant and a potential therapeutic target in bullous pemphigoid. *Journal of autoimmunity*, 96, 104–112.
- Chanpraph, K., Ounsakul, V., Pruettivorawongse, D., & Thadanipon, K. (2019). Anti-BP180 and anti-BP230 enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis and disease activity tracking of bullous pemphigoid: A prospective cohort study. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*.
- Chapman MA, Olague-Marchan M, Yancey KB, Giudice GJ, Fairley JA (2007). IgE class autoantibodies against BP180 in herpes gestationis and cicatricial pemphigoid. *J. Invest. Dermatol.*(127), 15.
- Charneux, J., Lorin, J., Vitry, F., Antonicelli, F., Reguiat, Z., Barbe, C., Tabary, T., Grange, F., & Bernard, P. (2011). Usefulness of BP230 and BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assays in the initial diagnosis of bullous pemphigoid: a retrospective study of 138 patients. *Archives of dermatology*, 147(3), 286–291.
- Chen, R., Fairley, J. A., Zhao, M.-L., Giudice, G. J., Zillikens, D., Diaz, L. A., & Liu, Z. (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. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, 169(7), 3987–3992.
- Chen, Y. J., Wu, C. Y., Lin, M. W., Chen, T. J., Liao, K. K., Chen, Y. C., Hwang, C. Y., Chu, S. Y., Chen, C. C., Lee, D. D., Chang, Y. T., Wang, W. J., & Liu, H. N. (2011). Comorbidity profiles among patients with bullous pemphigoid: a nationwide population-based study. *The British journal of dermatology*, 165(3), 593–599.
- Chiorean, R., Mahler, M., & Sitaru, C. (2014). Molecular diagnosis of autoimmune skin diseases. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*, 55(3 Suppl), 1019–1033.

- Claudepierre, T., Manglapus, M. K., Marengi, N., Radner, S., Champlaud, M.-F., Tasanen, K., Bruckner-Tuderman, L., Hunter, D. D., & Brunken, W. J. (2005). Collagen XVII and BPAG1 expression in the retina: evidence for an anchoring complex in the central nervous system. *The Journal of comparative neurology*, 487(2), 190–203.
- Cobo, M. F., Santi, C. G., Maruta, C. W., & Aoki, V. (2009). Pemphigoid gestationis: clinical and laboratory evaluation. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 64(11), 1043–1047.
- Cortés, B., Khelifa, E., Clivaz, L., Cazzaniga, S., Saurat, J. H., Naldi, L., & Borradori, L. (2012). Mortality rate in bullous pemphigoid: a retrospective monocentric cohort study. *Dermatology (Basel, Switzerland)*, 225(4), 320–325.
- Cozzani, E., Micalizzi, C., Parodi, A., & Rebora, A. (1997). Anti-230 kDa circulating IgE in bullous pemphigoid: relationship with disease activity. *Acta dermato-venereologica*, 77(3), 236.
- Daneshpazhooh, M. (2018). BPDAl and ABSIS correlate with serum anti-BP180 NC16A IgG but not with anti-BP230 IgG in patients with bullous pemphigoid. *Archives of dermatological research*, 310(3), 255–259.
- Delaporte, E., Dubost-Brama, A., Ghohestani, R., Nicolas, J. F., Neyrinck, J. L., Bergoend, H., Janin, A., & Capron, M. (1996). IgE autoantibodies directed against the major bullous pemphigoid antigen in patients with a severe form of pemphigoid. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, 157(8), 3642–3647.
- Delgado, J. C., Turbay, D., Yunis, E. J., Yunis, J. J., Morton, E. D., Bhol, K., Norman, R., Alper, C. A., Good, R. A., & Ahmed, R. (1996). A common major histocompatibility complex class II allele HLA-DQB1* 0301 is present in clinical variants of pemphigoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(16), 8569–8571.
- Della Torre, R., Combescure, C., Cortés, B., Marazza, G., Beltraminelli, H., Naldi, L., & Borradori, L. (2012). Clinical presentation and diagnostic delay in bullous pemphigoid: a prospective nationwide cohort. *The British journal of dermatology*, 167(5), 1111–1117.
- Di Zenzo, G., Calabresi, V., Grosso, F., Caproni, M., Ruffelli, M., & Zambruno, G. (2007). The intracellular and extracellular domains of BP180 antigen comprise novel epitopes targeted by pemphigoid gestationis autoantibodies. *The Journal of investigative dermatology*, 127(4), 864–873.

- Di Zenzo, G., Grosso, F., Terracina, M., Mariotti, F., Pità, O. de, Owaribe, K., Mastrogiacomo, A., Sera, F., Borradori, L., & Zambruno, G. (2004). Characterization of the anti-BP180 autoantibody reactivity profile and epitope mapping in bullous pemphigoid patients. *The Journal of investigative dermatology*, *122*(1), 103–110.
- Dimson, O. G., Giudice, G. J., Fu, C. L., van den Bergh, F., Warren, S. J., Janson, M. M., & Fairley, J. A. (2003). Identification of a potential effector function for IgE autoantibodies in the organ-specific autoimmune disease bullous pemphigoid. *The Journal of investigative dermatology*, *120*(5), 784–788.
- Döpp, R., Schmidt, E., Chimanovitch, I., Leverkus, M., Bröcker, E. B., & Zillikens, D. (2000). IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in Bullous pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *42*(4), 577–583.
- Dresow, S. K., Sitaru, C., Recke, A., Oostingh, G. J., Zillikens, D., & Gibbs, B. F. (2009). IgE autoantibodies against the intracellular domain of BP180. *The British journal of dermatology*, *160*(2), 429–432.
- Eftekhari, H., Rafiei, R., Yousefkhani, L., Rafiei, E., Darjani, A., Alizade, N., Gharaei Nejad, K., Zeinab Azimi, S., Rafiee, B., & Najirad, S. (2018). Association between Immunofluorescence Pattern and Mucosal Involvement in Patients with Bullous Pemphigoid. *Acta dermatovenerologica Croatica ADC*, *26*(3), 243–248.
- Engineer, L., Bhol, K., Kumari, S., & Razzaque, A. A. (2001). Bullous pemphigoid: interaction of interleukin 5, anti-basement membrane zone antibodies and eosinophils. A preliminary observation. *Cytokine*, *13*(1), 32–38.
- Esmaili, N., Mortazavi, H., Chams-Davatchi, C., Daneshpazhooh, M., Damavandi, M. R., Aryanian, Z., & Amirzargar, A. A. (2013). Association between HLA-DQB1*03:01 and Bullous pemphigoid in Iranian patients. *Iranian journal of immunology IJI*, *10*(1), 1–9.
- Fairley, J. A., Baum, C. L., Brandt, D. S., & Messingham, K. A. N. (2009). Pathogenicity of IgE in autoimmunity: successful treatment of bullous pemphigoid with omalizumab. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *123*(3), 704–705.
- Fairley, J. A., Burnett, C. T., Fu, C.-L., Larson, D. L., Fleming, M. G., & Giudice, G. J. (2007). A pathogenic role for IgE in autoimmunity: bullous pemphigoid IgE

- reproduces the early phase of lesion development in human skin grafted to nu/nu mice. *The Journal of investigative dermatology*, 127(11), 2605–2611.
- Fania, L., Caldarola, G., Müller, R., Brandt, O., Pellicano, R., Feliciani, C., & Hertl, M. (2012). IgE recognition of bullous pemphigoid (BP)180 and BP230 in BP patients and elderly individuals with pruritic dermatoses. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 143(3), 236–245.
- Feldrihan, V., Licarete, E., Florea, F., Cristea, V., Popescu, O., Sitaru, C., & Chiriac, M. T. (2014). IgG antibodies against immunodominant C-terminal epitopes of BP230 do not induce skin blistering in mice. *Human immunology*, 75(4), 354–363.
- Feng, S., Wu, Q., Jin, P., Lin, L., Zhou, W., Sang, H., & Shao, C. (2008). Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *International journal of dermatology*, 47(3), 225–228.
- Fukuchi, O., Suko, A., Matsuzaki, H., Baba, H., Yoshida, H., Takeuchi, T., Odawara, S., Fukuda, S., & Hashimoto, T. (2013). Anti-laminin-332 mucous membrane pemphigoid with autoantibodies to $\alpha 3$, $\beta 3$ and $\gamma 2$ subunits of laminin-332 as well as to BP230 and periplakin associated with adenocarcinoma from an unknown primary site. *The Journal of dermatology*, 40(1), 61–62.
- Ghohestani, R. F., Cozzani, E., Delaporte, E., Nicolas, J. F., Parodi, A., & Claudy, A. (1998). IgE antibodies in sera from patients with bullous pemphigoid are autoantibodies preferentially directed against the 230-kDa epidermal antigen (BP230). *Journal of clinical immunology*, 18(3), 202–209.
- Goletz, S., Zillikens, D., & Schmidt, E. (2017). Structural proteins of the dermal-epidermal junction targeted by autoantibodies in pemphigoid diseases. *Experimental dermatology*, 26(12), 1154–1162.
- Graauw, E. de, Sitaru, C., Horn, M., Borradori, L., Yousefi, S., Simon, H.-U., & Simon, D. (2017). Evidence for a role of eosinophils in blister formation in bullous pemphigoid. *Allergy*, 72(7), 1105–1113.
- Gudi, V. S., White, M. I., Cruickshank, N., Herriot, R., Edwards, S. L., Nimmo, F., & Ormerod, A. D. (2005). Annual incidence and mortality of bullous pemphigoid in the Grampian Region of North-east Scotland. *The British journal of dermatology*, 153(2), 424–427.
- Guo, L., Degenstein, L., Dowling, J., Yu, Q. C., Wollmann, R., Perman, B., & Fuchs, E. (1995). Gene targeting of BPAG1: abnormalities in mechanical strength and

- cell migration in stratified epithelia and neurologic degeneration. *Cell*, 81(2), 233–243.
- Haeberle, S., Wei, X., Bieber, K., Goletz, S., Ludwig, R. J., Schmidt, E., Enk, A. H., & Hadaschik, E. N. (2018). Regulatory T-cell deficiency leads to pathogenic bullous pemphigoid antigen 230 autoantibody and autoimmune bullous disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 142(6), 1831-1842.e7.
- Hamada, T., Nagata, Y., Tomita, M., Salmhofer, W., & Hashimoto, T. (2001). Bullous pemphigoid sera react specifically with various domains of BP230, most frequently with C-terminal domain, by immunoblot analyses using bacterial recombinant proteins covering the entire molecule. *Experimental dermatology*, 10(4), 256–263.
- Hashimoto, T., Kursewicz, C. D., Fayne, R. A., Nanda, S., Shah, S. M., Nattkemper, L., Yokozeki, H., & Yosipovitch, G. (2019). Pathophysiological mechanisms of itch in bullous pemphigoid. *Journal of the American Academy of Dermatology*.
- Hashimoto, T., Ohzono, A., Teye, K., Numata, S., Hiroyasu, S., Tsuruta, D., Hachiya, T., Kuroda, K., Hashiguchi, M., Kawakami, T., & Ishii, N. (2017). Detection of IgE autoantibodies to BP180 and BP230 and their relationship to clinical features in bullous pemphigoid. *The British journal of dermatology*, 177(1), 141–151.
- Hayakawa, T., Teye, K., Hachiya, T., Uehara, R., Hashiguchi, M., Kawakami, T., Li, X., Tsuchisaka, A., Ohara, K., Sogame, R., Koga, H., Hamada, T., Ohata, C., Furumura, M., Ishii, N., Fukano, H., Shimozato, K., & Hashimoto, T. (2016). Clinical and immunological profiles of anti-BP230-type bullous pemphigoid: Restriction of epitopes to the C-terminal domain of BP230, shown by novel ELISAs of BP230-domain specific recombinant proteins. *European Journal of Dermatology*, 26(2), 155–163.
- Heimbach, L., Li, Z., Berkowitz, P., Zhao, M., Li, N., Rubenstein, D. S., Diaz, L. A., & Liu, Z. (2011). The C5a receptor on mast cells is critical for the autoimmune skin-blistering disease bullous pemphigoid. *The Journal of biological chemistry*, 286(17), 15003–15009.
- Holtsche, M. M., Goletz, S., van Beek, N., Zillikens, D., Benoit, S., Harman, K., Walton, S., English, J., Sticherling, M., Chapman, A., Levell, N. J., Groves, R., Williams, H. C., König, I. R., & Schmidt, E. (2018). Prospective study in bullous pemphigoid: association of high serum anti-BP180 IgG levels with increased

- mortality and reduced Karnofsky score. *The British journal of dermatology*, 179(4), 918–924.
- Hopkinson, S. B., & Jones, J. C. R. (2000). The N Terminus of the Transmembrane Protein BP180 Interacts with the N-terminal Domain of BP230, Thereby Mediating Keratin Cytoskeleton Anchorage to the Cell Surface at the Site of the Hemidesmosome. *Molecular Biology of the Cell*, 11(1), 277–286.
- Horstmann, D. (2016). *Mathematik für Biologen*. (2. überarbeitete und ergänzte Auflage). Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Hübner, F., König, I. R., Holtsche, M. M., Zillikens, D., Linder, R., & Schmidt, E. (2020). Prevalence and age distribution of pemphigus and pemphigoid diseases among paediatric patients in Germany. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology JEADV*, 34(11), 2600–2605.
- Hübner, F., Recke, A., Zillikens, D., Linder, R., & Schmidt, E. (2016). Prevalence and Age Distribution of Pemphigus and Pemphigoid Diseases in Germany. *The Journal of investigative dermatology*, 136(12), 2495–2498.
- Hurskainen, T., Kokkonen, N., Sormunen, R., Jackow, J., Löffek, S., Soininen, R., Franzke, C.-W., Bruckner-Tuderman, L., & Tasanen, K. (2015). Deletion of the major bullous pemphigoid epitope region of collagen XVII induces blistering, autoimmunization, and itching in mice. *The Journal of investigative dermatology*, 135(5), 1303–1310.
- Inoue, T., Yagami, A., Iwata, Y., Ishii, N., Hashimoto, T., & Matsunaga, K. (2016). Mucous membrane pemphigoid reactive only with BP230. *The Journal of dermatology*, 43(10), 1228–1229.
- Ishiura, N., Fujimoto, M., Watanabe, R., Nakashima, H., Kuwano, Y., Yazawa, N., Echigo, T., Okochi, H., & Tamaki, K. (2008). Serum levels of IgE anti-BP180 and anti-BP230 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *Journal of dermatological science*, 49(2), 153–161.
- Iwashita, K., Matsuyama, T., Akasaka, E., Mizutani, K., Yamamoto, K., Kondoh, A., Nozawa, M., Yagi, Y., Ikoma, N., Mabuchi, T., Shinagawa, H., Tamiya, S., Nuruki, H., Ohta, Y., Umezawa, Y., & Ozawa, A. (2007). The incidence of internal malignancies in autoimmune bullous diseases. *The Tokai journal of experimental and clinical medicine*, 32(1), 42–47.
- Iwata, Y., Komura, K., Koder, M., Usuda, T., Yokoyama, Y., Hara, T., Muroi, E., Ogawa, F., Takenaka, M., & Sato, S. (2008). Correlation of IgE autoantibody to

- BP180 with a severe form of bullous pemphigoid. *Archives of dermatology*, 144(1), 41–48.
- Izumi, K., Nishie, W., Beniko, M., & Shimizu, H. (2019). A Cross-Sectional Study Comparing the Prevalence of Bullous Pemphigoid Autoantibodies in 275 Cases of Type II Diabetes Mellitus Treated With or Without Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitors. *Frontiers in immunology*, 10, 1439.
- Joly, P., Baricault, S., Sparsa, A., Bernard, P., Bédane, C., Duvert-Lehembre, S., Courville, P., Bravard, P., Rémond, B., Doffoel-Hantz, V., & Bénichou, J. (2012). Incidence and mortality of bullous pemphigoid in France. *The Journal of investigative dermatology*, 132(8), 1998–2004.
- Joly, P., Benichou, J., Lok, C., Hellot, M. F., Saiag, P., Tancrede-Bohin, E., Sassolas, B., Labeille, B., Doutre, M. S., Gorin, I., Pauwels, C., Chosidow, O., Caux, F., Estève, E., Dutronc, Y., Sigal, M., Prost, C., Maillard, H., Guillaume, J. C., & Roujeau, J. C. (2005). Prediction of survival for patients with bullous pemphigoid: a prospective study. *Archives of dermatology*, 141(6), 691–698.
- Jordon, R. E., Beutner, E. H., Witebsky, E., Blumental, G., Hale, W. L., & Lever, W. F. (1967). Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. *JAMA*, 200(9), 751–756.
- Jung, M., Kippes, W., Messer, G., Zillikens, D., & Rzany, B. (1999). Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 41(2 Pt 1), 266–268.
- Kalińska-Bienias, A., Kowalczyk, E., Jagielski, P., Bienias, P., Kowalewski, C., & Woźniak, K. (2019). The association between neurological diseases, malignancies and cardiovascular comorbidities among patients with bullous pemphigoid: Case-control study in a specialized Polish center. *Advances in clinical and experimental medicine official organ Wroclaw Medical University*, 28(5), 637–642.
- Kalowska, M., Ciepiela, O., Kowalewski, C., Demkow, U., Schwartz, R. A., & Wozniak, K. (2016). Enzyme-linked Immunoassay Index for Anti-NC16a IgG and IgE Auto-antibodies Correlates with Severity and Activity of Bullous Pemphigoid. *Acta dermato-venereologica*, 96(2), 191–196.
- Kamata, A., Kurihara, Y., Funakoshi, T., Takahashi, H., Kuroda, K., Hachiya, T., Amagai, M., & Yamagami, J. (2019). Basement membrane zone IgE deposition

is associated with bullous pemphigoid disease severity and treatment results.
The British journal of dermatology.

- Kasperkiewicz, M., Shimanovich, I., Ludwig, R. J., Rose, C., Zillikens, D., & Schmidt, E. (2011). Rituximab for treatment-refractory pemphigus and pemphigoid: a case series of 17 patients. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 65(3), 552–558.
- Kippes, W., Schmidt, E., Roth, A., Rzany, B., Bröcker, E.-B., & Zillikens, D. (1999). Immunopathologische Veränderungen bei 115 Patienten mit bullösem Pemphigoid. *Der Hautarzt*, 50(12), 866–872.
- Kneisel, A., & Hertl, M. (2014). Bullöses Pemphigoid--Diagnostik und Therapie. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)*, 164(17-18), 363–371.
- Kodera, R., Chiba, Y., Tamura, Y., Miyazawa, R., Tanei, R., Mori, S., Ito, H., & Araki, A. (2019). Clinical characteristics of bullous pemphigoid in elderly patients with type 2 diabetes mellitus: The association with the use of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Nihon Ronen Igakkai zasshi. Japanese journal of geriatrics*, 56(1), 43–50.
- Kokkonen, N., Herukka, S.-K., Huilaja, L., Kokki, M., Koivisto, A. M., Hartikainen, P., Remes, A. M., & Tasanen, K. (2017). Increased Levels of the Bullous Pemphigoid BP180 Autoantibody Are Associated with More Severe Dementia in Alzheimer's Disease. *The Journal of investigative dermatology*, 137(1), 71–76.
- Kridin, K., & Bergman, R. (2018). Association of Bullous Pemphigoid With Dipeptidyl-Peptidase 4 Inhibitors in Patients With Diabetes: Estimating the Risk of the New Agents and Characterizing the Patients. *JAMA dermatology*, 154(10), 1152–1158.
- Kromminga, A., Scheckenbach, C., Georgi, M., Hagel, C., Arndt, R., Christophers, E., Bröcker, E. B., & Zillikens, D. (2000). Patients with bullous pemphigoid and linear IgA disease show a dual IgA and IgG autoimmune response to BP180. *Journal of autoimmunity*, 15(3), 293–300.
- Kromminga, A., Sitaru, C., Hagel, C., Herzog, S., & Zillikens, D. (2004). Development of an ELISA for the detection of autoantibodies to BP230. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 111(1), 146–152.
- Lamberts, A., Meijer, J. M., & Jonkman, M. F. (2018). Nonbullous pemphigoid: A systematic review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 78(5), 989-995.e2.

- Langan, S. M., Groves, R. W., & West, J. (2011). The relationship between neurological disease and bullous pemphigoid: a population-based case-control study. *The Journal of investigative dermatology*, 131(3), 631–636.
- Langan, S. M., Smeeth, L., Hubbard, R., Fleming, K. M., Smith, C. J. P., & West, J. (2008). Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)*, 337, a180.
- Lee, E. H., Kim, Y. H., Kim, S., Kim, S.-E., & Kim, S.-C. (2012). Usefulness of Enzyme-linked Immunosorbent Assay Using Recombinant BP180 and BP230 for Serodiagnosis and Monitoring Disease Activity of Bullous Pemphigoid. *Annals of dermatology*, 24(1), 45–55.
- Lee, J. B., Liu, Y., & Hashimoto, T. (2003). Cicatricial pemphigoid sera specifically react with the most C-terminal portion of BP180. *Journal of dermatological science*, 32(1), 59–64.
- Lever, W. F. (1951). Pemphigus: a histopathologic study. *A.M.A. archives of dermatology and syphilology*, 64(6), 727–753.
- Lever, W. F. (1953). *Pemphigus*.
- Lin, L., Hwang, B.-J., Culton, D. A., Li, N., Burette, S., Koller, B. H., Messingham, K. A., Fairley, J. A., Lee, J. J., Hall, R. P., An, L., Diaz, L. A., & Liu, Z. (2018). Eosinophils Mediate Tissue Injury in the Autoimmune Skin Disease Bullous Pemphigoid. *The Journal of investigative dermatology*, 138(5), 1032–1043.
- Liu, Z., Diaz, L. A., Troy, J. L., Taylor, A. F., Emery, D. J., Fairley, J. A., & Giudice, G. J. (1993). A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *The Journal of clinical investigation*, 92(5), 2480–2488.
- Liu, Z., Giudice, G. J., Swartz, S. J., Fairley, J. A., Till, G. O., Troy, J. L., & Diaz, L. A. (1995). The role of complement in experimental bullous pemphigoid. *The Journal of clinical investigation*, 95(4), 1539–1544.
- London, V. A., Kim, G. H., Fairley, J. A., & Woodley, D. T. (2012). Successful treatment of bullous pemphigoid with omalizumab. *Archives of dermatology*, 148(11), 1241–1243.
- Makita, E., Matsuzaki, Y., Fukui, T., Matsui, A., Minakawa, S., Nakano, H., Ito, K., Kijima, H., & Sawamura, D. (2021). Autoantibodies to BPAG1e Trigger Experimental Bullous Pemphigoid in Mice. *The Journal of investigative dermatology*, 141(5), 1167-1176.e3.

- Marazza, G., Pham, H. C., Schärer, L., Pedrazzetti, P. P., Hunziker, T., Trüeb, R. M., Hohl, D., Itin, P., Lautenschlager, S., Naldi, L., & Borradori, L. (2009). Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study. *The British journal of dermatology*, *161*(4), 861–868.
- Masmoudi, W., Vaillant, M., Vassileva, S., Patsatsi, A., Quereux, G., Moltrasio, C., Abasq, C., Prost-Squarcioni, C., Kottler, D., Kiritsi, D., Litrowski, N., Plantin, P., Friedrichsen, L., Zebrowska, A., Duvert-Lehembre, S., Hofmann, S., Ferranti, V., Jouen, F., Joly, P., & Hebert, V. (2021). International validation of the Bullous Pemphigoid Disease Area Index severity score and calculation of cut-off values for defining mild, moderate and severe types of bullous pemphigoid. *The British journal of dermatology*, *184*(6), 1106–1112.
- Messingham, K. A. N., Noe, M. H., Chapman, M. A., Giudice, G. J., & Fairley, J. A. (2009). A novel ELISA reveals high frequencies of BP180-specific IgE production in bullous pemphigoid. *Journal of immunological methods*, *346*(1-2), 18–25.
- Messingham, K. N., Holahan, H. M., Frydman, A. S., Fullenkamp, C., Srikantha, R., & Fairley, J. A. (2014). Human eosinophils express the high affinity IgE receptor, FcεRI, in bullous pemphigoid. *PloS one*, *9*(9), e107725.
- Messingham, K. N., Srikantha, R., DeGueme, A. M., & Fairley, J. A. (2011). FcR-independent effects of IgE and IgG autoantibodies in bullous pemphigoid. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, *187*(1), 553–560.
- Miyamoto, D., Santi, C. G., Aoki, V., & Maruta, C. W. (2019). Bullous pemphigoid. *Anais brasileiros de dermatologia*, *94*(2), 133–146.
- Murrell, D. F., Daniel, B. S., Joly, P., Borradori, L., Amagai, M., Hashimoto, T., Caux, F., Marinovic, B., Sinha, A. A., Hertl, M., Bernard, P., Sirois, D., Cianchini, G., Fairley, J. A., Jonkman, M. F., Pandya, A. G., Rubenstein, D., Zillikens, D., Payne, A. S., Woodley, D., Zambruno, G., Aoki, V., Pincelli, C., Diaz, L., Hall, R. P., Meurer, M., Mascaro, J. M., Schmidt, E., Shimizu, H., Zone, J., Swerlick, R., Mimouni, D., Culton, D., Lipozencic, J., Bince, B., Grando, S. A., Bystry, J.-C., & Werth, V. P. (2012). Definitions and outcome measures for bullous pemphigoid: recommendations by an international panel of experts. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *66*(3), 479–485.
- Nagel, A., Lang, A., Engel, D., Podstawa, E., Hunzelmann, N., Pita, O. de, Borradori, L., Uter, W., & Hertl, M. (2010). Clinical activity of pemphigus vulgaris relates to

- IgE autoantibodies against desmoglein 3. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 134(3), 320–330.
- Nelson, K. C., Zhao, M., Schroeder, P. R., Li, N., Wetsel, R. A., Diaz, L. A., & Liu, Z. (2006). Role of different pathways of the complement cascade in experimental bullous pemphigoid. *The Journal of clinical investigation*, 116(11), 2892–2900.
- Nie, Z., & Hashimoto, T. (1999). IgA antibodies of cicatricial pemphigoid sera specifically react with C-terminus of BP180. *The Journal of investigative dermatology*, 112(2), 254–255.
- Nishie, W., Sawamura, D., Goto, M., Ito, K., Shibaki, A., McMillan, J. R., Sakai, K., Nakamura, H., Olasz, E., Yancey, K. B., Akiyama, M., & Shimizu, H. (2007). Humanization of autoantigen. *Nature medicine*, 13(3), 378–383.
- Noe, M. H., Messingham, K. A. N., Brandt, D. S., Andrews, J. I., & Fairley, J. A. (2010). Pregnant women have increased incidence of IgE autoantibodies reactive with the skin and placental antigen BP180 (type XVII collagen). *Journal of reproductive immunology*, 85(2), 198–204.
- Otten, J. V., Hashimoto, T., Hertl, M., Payne, A. S., & Sitaru, C. (2014). Molecular diagnosis in autoimmune skin blistering conditions. *Current molecular medicine*, 14(1), 69–95.
- Pas, H. H., Jong, M. C. de, Jonkman, M. F., Heeres, K., Slijper-Pal, I. J., & van der Meer, J. B. (1995). Bullous pemphigoid: serum antibody titre and antigen specificity. *Experimental dermatology*, 4(6), 372–376.
- Permin, H., & Wiik, A. (1978). The prevalence of IgE antinuclear antibodies in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section C, Immunology*, 86C(5), 245–249.
- Provost, T. T., & Tomasi, T. B. (1974). Immunopathology of bullous pemphigoid. Basement membrane deposition of IgE, alternate pathway components and fibrin. *Clinical and experimental immunology*, 18(2), 193–200.
- Roujeau, J. C., Lok, C., Bastuji-Garin, S., Mhalla, S., Enginger, V., & Bernard, P. (1998). High risk of death in elderly patients with extensive bullous pemphigoid. *Archives of dermatology*, 134(4), 465–469.
- Roussel, A., Benichou, J., Randriamanantany, Z. A., Gilbert, D., Drenovska, K., Houivet, E., Tron, F., & Joly, P. (2011). Enzyme-linked immunosorbent assay for the combination of bullous pemphigoid antigens 1 and 2 in the diagnosis of bullous pemphigoid. *Archives of dermatology*, 147(3), 293–298.

- Ruhrberg, C., & Watt, F. M. (1997). The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture. *Current opinion in genetics & development*, 7(3), 392–397.
- Rzany, B., Partscht, K., Jung, M., Kippes, W., Mecking, D., Baima, B., Prudlo, C., Pawelczyk, B., Messmer, E. M., Schuhmann, M., Sinkgraven, R., Büchner, L., Büdinger, L., Pfeiffer, C., Sticherling, M., Hertl, M., Kaiser, H.-W., Meurer, M., Zillikens, D., & Messer, G. (2002). Risk factors for lethal outcome in patients with bullous pemphigoid: low serum albumin level, high dosage of glucocorticosteroids, and old age. *Archives of dermatology*, 138(7), 903–908.
- Sadik, C. D., Pas, H. H., Bohlmann, M. K., Mousavi, S., Benoit, S., Sárdy, M., Terra, J. B., Lima, A. L., Hammers, C. M., van Beek, N., Bangert, C., Zillikens, D., & Schmidt, E. (2017). Value of BIOCHIP Technology in the Serological Diagnosis of Pemphigoid Gestationis. *Acta dermato-venereologica*, 97(1), 128–130.
- Sadik, C. D., & Schmidt, E. *Resolution in bullous pemphigoid*.
- Sakuma-Oyama, Y., Powell, A. M., Oyama, N., Albert, S., Bhogal, B. S., & Black, M. M. (2004). Evaluation of a BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assay in the initial diagnosis of bullous pemphigoid. *The British journal of dermatology*, 151(1), 126–131.
- Sams, W. M., & Gleich, G. J. (1971). Failure to transfer bullous pemphigoid with serum from patients. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 136(4), 1027–1031.
- Saniklidou, A. H., Tighe, P. J., Fairclough, L. C., & Todd, I. (2018). IgE autoantibodies and their association with the disease activity and phenotype in bullous pemphigoid: a systematic review. *Archives of dermatological research*, 310(1), 11–28.
- Schmidt, E., Obe, K., Bröcker, E. B., & Zillikens, D. (2000a). Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Archives of dermatology*, 136(2), 174–178.
- Schmidt, E., Reimer, S., Kruse, N., Jainta, S., Bröcker, E. B., Marinkovich, M. P., Giudice, G. J., & Zillikens, D. (2000b). Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*, 115(5), 842–848.

- Schmidt, E., Skrobek, C., Kromminga, A., Hashimoto, T., Messer, G., Bröcker, E. B., Yancey, K. B., & Zillikens, D. (2001). Cicatricial pemphigoid: IgA and IgG autoantibodies target epitopes on both intra- and extracellular domains of bullous pemphigoid antigen 180. *The British journal of dermatology*, 145(5), 778–783.
- Schmidt, E., Sticherling, M., Sárdy, M., Eming, R., Goebeler, M., Hertl, M., Hofmann, S. C., Hunzelmann, N., Kern, J. S., Kramer, H., Nast, A., Orzechowski, H.-D., Pfeiffer, C., Schuster, V., Sitaru, C., Zidane, M., Zillikens, D., & Worm, M. (2020). S2k guidelines for the treatment of pemphigus vulgaris/foiaceus and bullous pemphigoid: 2019 update. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology JDDG*, 18(5), 516–526.
- Schmidt, E., & Zillikens, D. (2010). Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. *Autoimmunity reviews*, 10(2), 84–89.
- Schmidt, E., & Zillikens, D. (2011a). Diagnosis and treatment of patients with autoimmune bullous disorders in Germany. *Dermatologic clinics*, 29(4), 663–671.
- Schmidt, E., & Zillikens, D. (2011b). The diagnosis and treatment of autoimmune blistering skin diseases. *Deutsches Arzteblatt international*, 108(23), 399-405, I-III.
- Schmidt, E., & Zillikens, D. (2013). Pemphigoid diseases. *The Lancet*, 381(9863), 320–332.
- Schulze, F., Kasperkiewicz, M., Zillikens, D., & Schmidt, E. (2013). Bullöses Pemphigoid. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, 64(12), 931-43; quiz 944-5.
- Schulze, F., Neumann, K., Recke, A., Zillikens, D., Linder, R., & Schmidt, E. (2015). Malignancies in pemphigus and pemphigoid diseases. *The Journal of investigative dermatology*, 135(5), 1445–1447.
- Schulze, F. S., Beckmann, T., Nimmerjahn, F., Ishiko, A., Collin, M., Köhl, J., Goletz, S., Zillikens, D., Ludwig, R., & Schmidt, E. (2014). Fcγ receptors III and IV mediate tissue destruction in a novel adult mouse model of bullous pemphigoid. *The American journal of pathology*, 184(8), 2185–2196.
- Schwarm, C., Gola, D., Holtsche, M. M., Dieterich, A., Bhandari, A., Freitag, M., Nürnberg, P., Toliat, M., Lieb, W., Wittig, M., Franke, A., Worm, M., Sticherling, M., Ehrchen, J., Günther, C., Gläser, R., Peitsch, W. K., Sárdy, M., Eming, R.,

- Hertl, M., Benoit, S., Goebeler, M., Pföhler, C., Kunz, M., Kreuter, A., van Beek, N., Erdmann, J., Busch, H., Zillikens, D., Sadik, C. D., Hirose, M., König, I. R., Schmidt, E., & Ibrahim, S. M. (2021). Identification of two novel bullous pemphigoid-associated alleles, HLA-DQA1*05:05 and -DRB1*07:01, in Germans. *Orphanet journal of rare diseases*, 16(1), 228.
- Seppänen, A. O. (2012). Both bullous pemphigoid antigens are expressed in the central nervous system. *The British journal of dermatology*, 166(3), 683–684.
- Shih, Y.-C., Yuan, H., Shen, J., Zheng, J., & Pan, M. (2021). BP230 IgE autoantibodies in topical-steroid-resistant bullous pemphigoid. *The Journal of dermatology*.
- Sinéad M. Langan, Richard W. Groves, & Joe West. The Relationship between Neurological Disease and Bullous Pemphigoid: A Population-Based Case–Control Study.
- Sitaru, C., Dährnich, C., Probst, C., Komorowski, L., Blöcker, I., Schmidt, E., Schlumberger, W., Rose, C., Stöcker, W., & Zillikens, D. (2007). Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies. *Experimental dermatology*, 16(9), 770–777.
- Sitaru, C., Powell, J., Messer, G., Bröcker, E.-B., Wojnarowska, F., & Zillikens, D. (2004). Immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of pemphigoid gestationis. *Obstetrics and gynecology*, 103(4), 757–763.
- Skaria, M., Jaunin, F., Hunziker, T., Riou, S., Schumann, H., Bruckner-Tuderman, L., Hertl, M., Bernard, P., Saurat, J. H., Favre, B., & Borradori, L. (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. *The Journal of investigative dermatology*, 114(5), 998–1004.
- Sonnenberg, A., Nievers, M., Schaapveld, R., Geerts, D., Niessen, C., & Borradori, L. (1999). Interaction of BP180 and alpha6beta4. *The Journal of investigative dermatology*, 112(5), 830–832.
- Ständer, S., Schmidt, E., Zillikens, D., Ludwig, R. J., & Kridin, K. (2021a). Immunological features and factors associated with mucocutaneous bullous pemphigoid - a retrospective cohort study. *Journal der Deutschen*

Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology JDDG, 19(9), 1289–1295.

- Ständer, S., Schmidt, E., Zillikens, D., Ludwig, R. J., & Kridin, K. (2021b). More Severe Erosive Phenotype Despite Lower Circulating Autoantibody Levels in Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor (DPP4i)-Associated Bullous Pemphigoid: A Retrospective Cohort Study. *American Journal of Clinical Dermatology*, 22(1), 117–127.
- Taghipour, K., Chi, C.-C., Vincent, A., Groves, R. W., Venning, V., & Wojnarowska, F. (2010). The association of bullous pemphigoid with cerebrovascular disease and dementia: a case-control study. *Archives of dermatology*, 146(11), 1251–1254.
- Tani, N., Kimura, Y., Koga, H., Kawakami, T., Ohata, C., Ishii, N., & Hashimoto, T. (2015). Clinical and immunological profiles of 25 patients with pemphigoid gestationis. *The British journal of dermatology*, 172(1), 120–129.
- Taquin, H., Chiaverini, C., & Lacour, J. P. (2016). Spectrum of Clinical Responses to Therapies in Infantile Bullous Pemphigoid. *Pediatric dermatology*, 33(2), e77-81.
- Ujiie, H., Shibaki, A., Nishie, W., & Shimizu, H. (2010). What's new in bullous pemphigoid. *The Journal of dermatology*, 37(3), 194–204.
- van Beek, N., Dährnich, C., Johannsen, N., Lemcke, S., Goletz, S., Hübner, F., Di Zenzo, G., Dmochowski, M., Drenovska, K., Geller, S., Horn, M., Kowalewski, C., Medenica, L., Murrell, D. F., Patsatsi, A., Uzun, S., Vassileva, S., Zillikens, D., Schlumberger, W., & Schmidt, E. (2017a). Prospective studies on the routine use of a novel multivariant enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of autoimmune bullous diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 76(5), 889-894.e5.
- van Beek, N., Lüttmann, N., Huebner, F., Recke, A., Karl, I., Schulze, F. S., Zillikens, D., & Schmidt, E. (2017b). Correlation of Serum Levels of IgE Autoantibodies Against BP180 With Bullous Pemphigoid Disease Activity. *JAMA dermatology*, 153(1), 30–38.
- van Beek, N., Rentzsch, K., Probst, C., Komorowski, L., Kasperkiewicz, M., Fechner, K., Bloecker, I. M., Zillikens, D., Stöcker, W., & Schmidt, E. (2012). Serological diagnosis of autoimmune bullous skin diseases: prospective comparison of the BIOCHIP mosaic-based indirect immunofluorescence

- technique with the conventional multi-step single test strategy. *Orphanet journal of rare diseases*, 7, 49.
- van Beek, N., Schulze, F. S., Zillikens, D., & Schmidt, E. (2016). IgE-mediated mechanisms in bullous pemphigoid and other autoimmune bullous diseases. *Expert review of clinical immunology*, 12(3), 267–277.
- van Beek, N., Weidinger, A., Schneider, S. W., Kleinheinz, A., Gläser, R., Holtsche, M. M., Georg, A. von, Hammers, C. M., Hübner, F., Lima, A.-L., Gola, D., Sadik, C. D., Zillikens, D., Katalinic, A., Schmidt, E., & König, I. R. (2021a). Incidence of pemphigoid diseases in Northern Germany in 2016 - first data from the Schleswig-Holstein Registry of Autoimmune Bullous Diseases. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology JEADV*, 35(5), 1197–1202.
- van Beek, N., Zillikens, D., & Schmidt, E. (2018). Diagnosis of autoimmune bullous diseases. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology JDDG*, 16(9), 1077–1091.
- van Beek, N., Zillikens, D., & Schmidt, E. (2021b). Bullous Autoimmune Dermatoses: Clinical Features, Diagnostic Evaluation, and Treatment Options. *Deutsches Arzteblatt international*, 118(24), 413–420.
- Varpuluoma, O., Försti, A.-K., Jokelainen, J., Turpeinen, M., Timonen, M., Huilaja, L., & Tasanen, K. (2018). Vildagliptin Significantly Increases the Risk of Bullous Pemphigoid: A Finnish Nationwide Registry Study. *The Journal of investigative dermatology*, 138(7), 1659–1661.
- Venning, V. A., & Wojnarowska, F. (1995). Induced bullous pemphigoid. *The British journal of dermatology*, 132(5), 831–832.
- Vodegel, R. M., Jonkman, M. F., Pas, H. H., & Jong, M. C. J. M. de (2004). U-serrated immunodeposition pattern differentiates type VII collagen targeting bullous diseases from other subepidermal bullous autoimmune diseases. *The British journal of dermatology*, 151(1), 112–118.
- Walmsley, N., & Hampton, P. (2011). Bullous pemphigoid triggered by swine flu vaccination: case report and review of vaccine triggered pemphigoid. *Journal of dermatological case reports*, 5(4), 74–76.
- Witte, M., Zillikens, D., & Schmidt, E. (2018). Diagnosis of Autoimmune Blistering Diseases. *Frontiers in medicine*, 5, 296.

- Wong, S. N., & Chua, S. H. (2002). Spectrum of subepidermal immunobullous disorders seen at the National Skin Centre, Singapore: a 2-year review. *The British journal of dermatology*, 147(3), 476–480.
- Yancey, K. B. (1995). Adhesion molecules. II: Interactions of keratinocytes with epidermal basement membrane. *The Journal of investigative dermatology*, 104(6), 1008–1014.
- Yang, Y., Dowling, J., Yu, Q. C., Kouklis, P., Cleveland, D. W., & Fuchs, E. (1996). An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell*, 86(4), 655–665.
- Yayli, S., Pelivani, N., Beltraminelli, H., Wirthmüller, U., Beleznay, Z., Horn, M., & Borradori, L. (2011). Detection of linear IgE deposits in bullous pemphigoid and mucous membrane pemphigoid: a useful clue for diagnosis. *The British journal of dermatology*, 165(5), 1133–1137.
- Yoshida, M., Hamada, T., Amagai, M., Hashimoto, K., Uehara, R., Yamaguchi, K., Imamura, K., Okamoto, E., Yasumoto, S., & Hashimoto, T. (2006). Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. *Journal of dermatological science*, 41(1), 21–30.
- Yu, K. K., Crew, A. B., Messingham, K. A. N., Fairley, J. A., & Woodley, D. T. (2014). Omalizumab therapy for bullous pemphigoid. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71(3), 468–474.
- Zhang, Y., Hwang, B.-J., Liu, Z., Li, N., Lough, K., Williams, S. E., Chen, J., Burette, S. W., Diaz, L. A., Su, M. A., Xiao, S., & Liu, Z. (2018). BP180 dysfunction triggers spontaneous skin inflammation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(25), 6434–6439.
- Zone, J. J., Taylor, T., Hull, C., Schmidt, L., & Meyer, L. (2007). IgE basement membrane zone antibodies induce eosinophil infiltration and histological blisters in engrafted human skin on SCID mice. *The Journal of investigative dermatology*, 127(5), 1167–1174.

8. Anhang

8.1. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BP	Bullöses Pemphigoid
BPDAI	Bullouse Pemphigoid Disease Area Index
BSA	Bovines Serumalbumin
D	Tag
DEJ	Dermoepidermale Junktionszone
DIF	Direkte Immunfluoreszens
DPP4I	Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor
EBA	Epidermolysis bullosa aquisata
ELISA	Enzyme Linked Immunsorbent Assay
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HLA	Human Leucocyte Antigens
Ig	Immunglobuline
IIF	Indirekte Immunfluoreszens
IL	Interleukin
IVIG	intravenöse Immunglobuline
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht

LAD	Lineare IgA Dermatose
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MMP	Magermilchpulver
NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
OD-b	Optische Dichte abzüglich der optischen Dichte des Leerwertes
PG	Pemphigoid gestationis
PV	Pemphigus vulgaris
ROC	Receiver Operating Characteristic
RT	Raumtemperatur
SDS(-PAGE)	Sodium-Dodecyl-Sulfat(-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
SHP	Schleimhautpemphigoid
Tab.	Tabelle
TBST	Ttris-buffered saline plus tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
UV	ultraviolett
V	Volt
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius

8.2. Material

Geräte und Hilfsmittel

Name	Hersteller
Elektrophoresekammer Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
ELISA Reader (Opsys MR)	Dynex Technologies GmbH, Denkendorf
ELISA Reader (GloMax)	Promega Corporation, Madison, USA
Falcon 50 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Faserschwämme	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
G 7883 (Spülmaschiene)	Miele & Cie. KG, Gütersloh
Gefrierschrank (-20° C)	Robert Bosch GmbH, Gerlingen
Kühlraum	Viessmann Kältetechnik GmbH, Mainz
Laborabzug captairchem	Erlab Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen
Laborwecker	Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Magnetrührer IKA ® RH basic 2	IKA ® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Messzylinder 100ml	Vit Lab GmbH, Grossostheim
Messzylinder 250ml	Vit Lab GmbH, Grossostheim
Midi-Rack, gelb 10 Plätze	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Mini-PROTEAN3 Gelkammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini Trans-Blot Cell Gelkassette	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Netzgerät PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multikanal Pipette 300	Eppendorf AG, Hamburg
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pinzette	Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe
Reaktionsgefäßständer	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Research Pipette (10, 20, 100, 200, 1000)	Eppendorf AG, Hamburg
Rührmagnet	Keison Products, Chelmsford, England
Schütteltisch Duomax 1030	Heidolph Instruments, Nürnberg
Serologische Pipette (5, 10, 25ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
0,75 mm Spacer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tischzentrifuge (Rotor: Sorvall 3328)	Haereus Instruments GmbH, Hanau
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York City, New York, USA
Wanne	Hindrex, Wuppertal

Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller
Acrylamid 4K-Lösung (30%) Sigma-	AppliChem, Darmstadt
AGFA G 153 Entwickler	BW Plus Röntgen GmbH & Co.KG, Kamp-Lintfort
AGFA G 354 Fixier	BW Plus Röntgen GmbH & Co.KG, Kamp-Lintfort
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Medical Systems Information Technologies GmbH, Freiburg
Ammonium Persulfate (APS)	Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Aqua dest.	Apotheke UK-SH Lübeck
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethanol 70%	KAUTEX TEXTRON GMBH & CO. KG, Bonn-Holzlar
Fast Green	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Magermilchpulver	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol 99,8%	J. T. Baker, Deventer, Niederlande

Protein-Standard (farbmarkiert)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
TEMED	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Verwendete Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Blot-Filterpapier	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
Nitrozellulose Membran	Whatman GmbH, Dassel
Peha-soft Handschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Pipettenspitze (10, 100, 200, 1000)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Pipettenspitze 300	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische-Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Biochrom AG, Berlin
Skalpellsklingen (einmal)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Universalfilm Super RX-N	Fujifilm, Tokio, Japan

Verwendete Puffer und Gele

Laufpuffer 5-fach	15 g/l Tris Base; 72 g/l Glycin; 5 g/l SDS in Aqua dest
Transferpuffer.	100 ml Tris-Glycin 10-fach; 200 ml Methanol; 700 ml Aqua dest
Trenngel 12 %	Aqua dest 3,42 ml, 1,5M Tris pH 8,8 2,5 ml ml, 30% Acrylamid 3,96 ml, 10% SDS 100 µl, TEMED 12 µl, 10% APS 50 µl
Sammelgel 4%	Aqua dest 3 ml, 0,5M Tris pH 6,8 1,25 ml, 30% Acrylamid 670 µl, 10% SDS 50 µl, TEMED 12 µl, 10% APS 70 µl

Sonstiges

Name	Hersteller
Anti-BP180-NC16A-4X-ELISA (IgG)	EUROIMMUN medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Anti-BP230-CF-ELISA (IgG)	EUROIMMUN medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Gesamt-IgE-ELISA	EUROIMMUN medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Rabbit Anti-Mouse polyklonaler Antikörper	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Konjugat IgE	EUROIMMUN medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck

9. Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

1. **Linnemann, B. E.**, Neumann, A., and Shimanovich, I. 2021. Multiple Facial Ulcers Following a Stroke. *JAMA neurology*
2. Pruessmann, J., Pruessmann, W., Holtsche, M. M., **Linnemann, B.E.**, Hammers, C. M., van Beek, N., Zillikens, D., Schmidt, E., and Sadik, C. D. 2021. Immunomodulator Galectin-9 is Increased in Blood and Skin of Patients with Bullous Pemphigoid. *Acta dermato-venereologica* 101, 3, adv00419.
3. Belheouane, M., Hermes, B.M., Van Beek, N., Benoite, S., Bernard, P., Drenovska, K., Gerdes, S., Gläser, R., Goebeler, M., Günther, C., von Georg, A., Hammers, C.M., Holtsche, M.M.; Homey, B., Horváth, O.N., Hübner, F., **Linnemann, B.E.**, Joly, P, Márton, D., Patsatsi, A., Pföhler, C., Sárdy, M., Huilaja, L., Vassileva, S., Zillikens, D., Ibrahim, S., Sadik, C.D., Schmidt, E., Baines, J.F., 2022, Characterization of the skin microbiota in bullous pemphigoid patients and controls reveals novel microbial indicators of disease. *Journal of Advanced Research*

Kongressbeiträge

1. **Linnemann, B.E.**: Zirkulierende Anti-BP230 IgE-Antikörper von Patienten mit bullösem Pemphigoid korrelieren mit dem Krankheitsverlauf. 51. Tagung der Deutsche Dermatologische Gesellschaft (DDG) 14.04.-17.04.2021 virtuell
2. **Linnemann, B.E.**: Neurotrophe Ulcera durch Schädigung des Nervus trigeminus. 115. Tagung der Schleswig-Holsteiner Dermatologen 29.05.2021 virtuell

10. Danksagungen

Im Folgenden möchte ich einigen Personen danken, ohne die das Verfassen dieser Dissertationsschrift nicht möglich gewesen wäre.

Meinen herzlichen Dank richte ich zunächst an meinen Doktorvater Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. Enno Schmidt für die Bereitstellung des Themas, die Aufnahme in seine Forschungsgruppe und die vorbildliche Begleitung während der Dissertation.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. med. habil. Detlef Zillikens, als Leiter der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, für die Möglichkeit Seren und klinische Informationen der Patienten nutzen zu können.

Des Weiteren danke ich meiner Betreuerin Dr. med. Nina van Beek für ihre Unterstützung während des praktischen Teils meiner Promotionsarbeit und bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse. Ich werde die stets freundliche und vertrauensvolle Zusammenarbeit in guter Erinnerung behalten.

Auch PD Dr. med. habil. Andreas Recke möchte ich dafür danken, dass er mir bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse geholfen hat.

Für die geleistete Vorarbeit zu dieser Promotion bedanke ich mich bei Frau Dr. med. Annabelle von Georg.

An dieser Stelle danke ich allen Mitarbeitern der Forschungslabore für die Unterstützung. Besonders hervorheben möchte ich Vanessa Krull und Dr. rer. nat. Stephanie Goletz, die mir bei dem praktischen Teil dieser Dissertation stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein besonderer Dank geht an meinen Ehemann, der mich während meines Studiums stets geduldig unterstützt, Verständnis für die Promotion aufgebracht und mir bei der gestalterischen Umsetzung dieser geholfen hat.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern und meinem Bruder, dass sie mich während des Studiums und der Promotion jederzeit unterstützt haben.