

Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. M. Hertl

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

**Etablierung eines ELISAs zum Nachweis von Autoantikörpern gegen  
Desmocollin 1,2 und 3 in Seren von Patienten mit Pemphigus-Erkrankung**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Barbara Heber aus Oberhausen

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität

Marburg am 25.02.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. M. Hertl

Correferent: PD Dr. Dr. H. G. Wahl

Für meine Eltern

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis .....	VIII
Abkürzungsverzeichnis .....	IX
1 Einleitung .....	XI
1.1 Die Haut .....	XI
1.1.1 Die Epidermis .....	2
1.1.2 Die Dermis .....	3
1.1.3 Die Subkutis .....	4
1.1.4 Dermoepidermale Junktionszone .....	4
1.1.5 Desmosomen .....	4
1.1.6 Desmocolline .....	7
1.1.7 Weitere desmosomale Proteine .....	8
1.1.7.1 Desmogleine .....	8
1.1.7.2 Desmoplakine .....	9
1.1.7.3 Plakoglobin .....	10
1.2 Das Immunsystem .....	10
1.2.1 Funktionen der Lymphozyten .....	11
1.2.2 Toleranz und Autoimmunität .....	15
1.3 Pemphigus .....	17
1.3.1 Pemphigus vulgaris .....	19
1.3.1.1 Sonderformen des Pemphigus vulgaris .....	26
1.3.1.2 Pemphigus vegetans .....	26
1.3.1.3 Pemphigus herpetiformis .....	26
1.3.2 Pemphigus foliaceus .....	27
1.3.2.1 Sonderformen des Pemphigus foliaceus .....	28
1.3.2.2 Fogo selvagem .....	28
1.3.2.3 Pemphigus erythematosis (Senear-Usher-Syndrom) .....	29
1.3.3 IgA-Pemphigus .....	29
1.3.4 Paraneoplastischer Pemphigus .....	30
1.3.5 Medikamentös induzierter Pemphigus .....	34
1.4 Zielsetzung der Arbeit .....	35
2 Material und Methoden .....	37
2.1 Das Baculovirus-Expressionssystem .....	37
2.2 Verwendetes rekombinantes Protein .....	38
2.3 Insektenzellkultur .....	38
2.4 Virusamplifikation .....	39
2.5 Produktion der rekombinanten Desmocolline .....	40
2.6 Proteinaufreinigung .....	41
2.7 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) .....	43
2.8 Gelfärbung .....	45
Coomassie-Färbung .....	45
2.9 Western Blot .....	45
2.10 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	47
2.11 Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay (ELISA) .....	48

2.12 Patienten und Kontrollen.....	50
2.13 Geräte .....	53
3 Ergebnisse .....	55
3.1 Herstellung der rekombinanten Dsc-Proteine .....	55
3.1.1 Nachweis der erfolgten Transfektion und Virusamplifikation durch Licht- und Fluoreszenzmikroskopie .....	55
3.1.2 Nachweis der rekombinanten Proteine mittels Western Blot .....	56
3.1.3 Etablierung des ELISA.....	58
3.1.3.1 Detektion von Antikörpern des Typs IgG und IgA.....	59
3.1.3.2 Versuchsmodifizierung .....	60
3.1.4 Nachweis der rekombinanten Desmocolline mittels ELISA.....	61
3.2 Testung von Patienten und Negativkontrollen auf Autoantikörper gegen Dsc mittels ELISA .....	63
3.2.1 Klassifizierte Patienten mit Pemphigus vulgaris.....	63
3.2.2 Patienten mit IgA-Pemphigus, PNP und atypischem Pemphigus ...	65
3.2.3 Patienten mit Verdacht auf Pemphigus.....	66
3.3 Testung ausgewählter Patienten mittels Western Blot .....	68
3.3.1 Western Blot einer gesunden Kontrollperson .....	68
3.3.2 Testung des Patienten mit PNP .....	69
3.3.3 Testung des Patienten mit IgA-Pemphigus.....	70
3.4 Autoantikörper gegen Dsc bei Patienten mit atypischem Pemphigus.....	70
3.4.1 Patient #1 mit atypischem Pemphigus.....	70
3.4.2 Patient #2 mit atypischem Pemphigus.....	71
4 Diskussion .....	75
4.1 Etablierung des ELISA .....	77
4.2 Versuchsmodifizierung.....	77
4.3 Autoantikörper-Reaktivitäten von PV-Patienten gegen Dsc .....	78
4.4 Autoantikörper-Reaktivitäten von Patienten mit IgA-Pemphigus .....	79
4.5 Autoantikörper-Reaktivitäten von Patienten mit PNP.....	80
4.6 Autoantikörper-Reaktivitäten von Patienten mit atypischem Pemphigus	80
4.7 Dsc als Autoantigene der Pemphigus-Erkrankung.....	81
4.8 ELISA als diagnostisches Tool zur Detektion von anti-Dsc-Antikörpern	85
4.9 Pathogenität der anti-Dsc-Autoantikörper.....	87
4.10 Ausblick.....	88
5 Zusammenfassung .....	90
6 Literaturverzeichnis.....	92
7 Anhang.....	110

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1** Schematische Struktur eines Desmosoms (nach Waschke, 2008)
- Abb. 1.2** Ultrastruktur der Desmogleine und Desmocolline (aus Huber, 2003)
- Abb. 1.3** Ultrastruktur eines Immunglobulins (aus Hof et al., 2005)
- Abb. 1.4a** Ultrastruktur eines IgG-Immunglobulins (aus Hof et al., 2005)
- Abb. 1.4b** Ultrastruktur eines IgA-Immunglobulins (aus Hof et al., 2005)
- Abb. 1.5** Die Desmoglein-Kompensationstheorie (nach Amagai, 1999a)
- Abb. 3.1** Darstellung virusinfizierter SF-21-Zellen mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie
- Abb. 3.2a:** Rekombinante Proteine, die die extrazelluläre Domäne von Dsg3, Dsg1 und Dsc1-3 darstellen
- Abb. 3.2b** Nachweis der rekombinanten Proteine mittels Western Blot (nach Müller et al., 2009)
- Abb. 3.3a** IgG-Reaktivität gegen Dsg3 und Dsc1-3 bei Patienten mit PV in verschiedenen Krankheitsstadien (akut, chronisch, in Remission)
- Abb. 3.3b** IgG-Reaktivität gegen Dsg3 und Dsc1-3 bei Patienten mit PV mit unterschiedlichen klinischen Phänotypen (mukosal, mukokutan, kutan)
- Abb. 3.4a** IgG-Reaktivität gegen Dsg3/1 und Dsc1-3 bei Patienten mit IgA-Pemphigus, PNP und atypischem Pemphigus
- Abb. 3.4b** IgA-Reaktivität gegen Dsg3/1 und Dsc1-3 bei Patienten mit IgA-Pemphigus, PNP und atypischem Pemphigus

- Abb. 3.5a** Darstellung der IgG-Reaktivität gegen Dsg3 und Dsc1-3 von 32 Patienten mit Verdacht auf eine Pemphigus-Erkrankung
- Abb. 3.5b** IgA-Reaktivität gegen Dsg3 und Dsc1-3 von 32 Patienten mit Verdacht auf eine Pemphigus-Erkrankung
- Abb. 3.6** Western Blot einer gesunden Kontrollperson
- Abb. 3.7** Testung des PNP-Patienten mittels Western Blot (nach Müller et al., 2009)
- Abb. 3.8** Western Blot des IgA-Pemphigus-Patienten (nach Müller et al., 2009)
- Abb. 3.9** Nachweis von Antikörpern gegen Dsc1 bei Patient #1 mit atypischem Pemphigus im Western Blot (nach Müller et al., 2009)
- Abb. 3.10** Klinischer Verlauf von Patient #2 mit atypischen Pemphigus (aus Müller et al., 2009)
- Abb. 3.11** Histologische Untersuchung und Immunfluoreszenz (nach Müller et al., 2009)
- Abb. 3.12** IgA-Western Blot im Verlauf (aus Müller et al., 2009)
- Abb. 3.13** IgG-Western Blot im Verlauf

## **Tabellenverzeichnis**

**Tab. 1.1**      Klassifikation der Pemphigus-Erkrankung (nach Hertl und Schuler, 2002a; Hashimoto, 2003)

**Tab. 3.1**      Nachweis der rekombinanten Dsc im ELISA

## Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
APC	Antigen-präsentierende Zelle ( <i>antigen presenting cell</i> )
aqua dest	destilliertes Wasser
BP	bullöses Pemphigoid
CD	Differenzierungsmerkmal ( <i>cluster of differentiation</i> )
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
Dsg3EC1-5	Baculoprotein, welches die gesamte Ektodomäne des Desmoglein 3 beinhaltet
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked-immunosorbent-assay</i>
FS	Fogo selvagem
g	Erdschwerebeschleunigung
His	Histidin
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IEN	Intraepidermale neutrophile Dermatose
Ig	Immunglobulin
kD	Kilodalton
M	molar
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute
ml	Milliliter ( $10^{-3}$ Liter)
MW	Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> )

MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
μl	Mikroliter (10 <sup>-6</sup> Liter)
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate-buffered-saline</i> )
PF	Pemphigus foliaceus
PNP	Paraneoplastischer Pemphigus
PV	Pemphigus vulgaris
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodiumdodecylsulfate</i> )- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPD	subkorneale pustulöse Dermatose
TCR	T-Zellrezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
Th	T-Helferzelle
Tr	regulatorische T-Zelle
V	Volt

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Haut

Die Haut grenzt den menschlichen Körper von seiner Umwelt ab und nimmt beim Erwachsenen eine Fläche von 1,5 - 2 m<sup>2</sup> ein; sie wiegt 3,5 – 10 kg und ist somit das größte Organ des Menschen. Sie erfüllt lebenswichtige Funktionen wie den Schutz vor Wasserverlust und schädigenden Einflüssen aus der Außenwelt wie mechanischen Belastungen, chemischen Agenzien und Strahleneinwirkungen sowie vor zahlreichen Krankheitserregern wie beispielsweise Bakterien und Viren. Zudem ist sie der Sitz von Sinnesorganen (Mechano- und Thermorezeptoren sowie Nozizeptoren) und spielt durch ihre Gefäße und Schweißdrüsen eine wichtige Rolle in der Thermoregulation.

Die Hautdecke („Integumentum commune“) besteht aus der Kutis und der Subkutis; die Kutis wiederum gliedert sich in Epidermis und Dermis (s.u.). Die Haut besitzt im wesentlichen zwei unterschiedliche Oberflächenreliefs: die Leistenhaut, welche sich an Palmar- und Plantarflächen befindet und deren Muster genetisch determiniert ist, und die Felderhaut, welche die übrigen Körperoberflächen bedeckt (Jung und Moll, 2003; Lüllmann-Rauch, 2003).

Folgende Auflistung zeigt die Schichtung der Haut in der Übersicht:

- **Kutis:**
  - Epidermis (Oberhaut)
    - Stratum basale
    - Stratum spinosum
    - Stratum granulosum
    - Stratum lucidum (nur in Leistenhaut)
    - Stratum corneum
  - Dermis (Corium, Lederhaut)
    - Stratum papillare
    - Stratum reticulare

### - **Subkutis**

(Schiebler et al., 2002)

### 1.1.1 Die Epidermis

Bei der Epidermis handelt es sich um ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel, welches zu einem großen Teil aus Keratinozyten gebildet wird; zusätzlich findet man hier noch Melanozyten, Langer-Hans-Zellen, Merkelzellen und Lymphozyten. Nervenfasern kommen vor, jedoch keine Gefäße; die Versorgung der Epidermis erfolgt durch Diffusion aus der darunterliegenden, gefäßreichen Dermis. Die Dicke der Epidermis beträgt abhängig von Lokalisation, Alter und Geschlecht 30-300 µm. Sie ist ein typisches Proliferationsgewebe. Die einzelnen Schichten der Epidermis bauen sich wie folgt auf:

**Stratum basale:** Diese Schicht besteht aus einer Lage prismatischer Zellen mit großen Kernen und wenig Zytoplasma, die direkt der Basallamina anliegen. Man nennt sie Basalzellen. Normalerweise finden nur in dieser Schicht der Epidermis Mitosen statt. In kleinen Gruppen liegen hier Stammzellen beieinander.

**Stratum spinosum (Stachelzellschicht):** Hier befinden sich mehrere Lagen polygonaler Zellen; sie lassen im üblichen Präparat aufgrund artifizieller Schrumpfung ihre desmosomalen Kontakte besonders deutlich erkennen (daher „Stachelzellen“).

**Stratum granulosum:** In dieser Schicht enthalten die Keratinozyten (hier „Körnerzellen“) lichtmikroskopisch sichtbare basophile Keratohyalin granula und sind deutlich abgeflacht. Sie bilden eine bis mehrere Schichten aus.

**Stratum corneum (Hornschicht):** Diese Schicht besteht aus Hornzellen, die keinen Zellkern und keine Organellen mehr enthalten; sie sind dicht gefüllt mit Tonofilamenten und einer amorphen Matrix und nehmen die Form polygonaler Plättchen an.

In der Leistenhaut findet man zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum eine zusätzliche Schicht, das **Stratum lucidum**. Diese Schicht enthält Übergangsstadien zwischen Keratinozyten und Hornzellen.

Die Keratinozyten werden im Stratum basale gebildet und durchlaufen dann in einem Zeitraum von in etwa drei Wochen die Schichten der Epidermis, bis sie im Stratum corneum abgeschilfert werden. Der Zusammenhalt der Keratinozyten wird durch Desmosomen gewährleistet; Basalzellen werden durch Hemidesmosomen an der Basalmembran verankert (1.1.4 und 1.1.5) (Jung und Moll, 2003; Lüllmann-Rauch, 2003).

### 1.1.2 Die Dermis

Die Dermis (Corium, Lederhaut) stellt das unter der Epidermis gelegene Bindegewebe dar und erstreckt sich bis in die Tiefe zum subkutanen Fett. Sie besteht aus Zellen und Bindegewebsfasern, welche in eine gelartige Grundsubstanz eingebettet sind. Die dominierenden Zellen der Dermis sind die Fibroblasten, ebenso kommen Histozyten, Mastzellen sowie auch vereinzelte Melanozyten vor. Die wichtigsten Fasern der Dermis sind Kollagenfasern, der Typ Kollagen I herrscht hier vor. Zudem findet man noch Retikulinfasern (Kollagen Typ III), elastische Fasern und Verankerungsfibrillen (*anchoring fibrils*), welche aus Kollagen VII bestehen.

Die Dermis besteht aus dem Stratum papillare, welches in die Reteleisten der Epidermis hineinragt und durch die dermoepidermale Verbindungszone fest mit der Epidermis verankert ist, und aus dem Stratum reticulare.

**Stratum papillare:** Dieses oberflächliche, schmale Stratum ragt zapfenförmig in die epidermalen Reteleisten hinein; es besteht überwiegend aus Matrix, Zellen und Kapillaren.

**Stratum reticulare:** Hierbei handelt es sich um straffes, geflechtartiges Bindegewebe mit Kollagen-Typ-I-Fasern und begleitenden elastischen Fasern; diese Schicht verleiht der Haut ihre mechanische Widerstandsfähigkeit. Sie zeichnet sich durch Reißfestigkeit und reversible Dehnbarkeit aus. Im tiefen Stratum reticulare entspringen die Haarfollikel und die Schweißdrüsen (Schiebler et al., 2002; Jung und Moll, 2003; Lüllmann-Rauch, 2003).

### **1.1.3 Die Subkutis**

Sie besteht aus lockerem Binde- und Fettgewebe, in welches epifasziale Leitungsbahnen der Haut eingebettet sind. Das subkutane Fettgewebe wird von Bindegewebszügen (Retinacula cutis) durchzogen, wodurch die Kutis verschieblich an tiefer gelegenen Strukturen verankert wird (Lüllmann-Rauch, 2003).

### **1.1.4 Dermoepidermale Junktionszone**

Die Basalmembran besteht aus extrazellulären Matrixstrukturen und dient der Trennung unterschiedlicher Gewebe. Die Basalmembran der Epidermis ist eine dünne Schicht mit einem Durchmesser von ungefähr 30-150 nm; sie besteht aus zwei Schichten, und zwar aus der zur Epidermis hin gelegenen Lamina lucida und der darunter gelegenen Lamina densa. Die Basalzellen der Epidermis haften fest mittels Hemidesmosomen auf der Lamina lucida; die Lamina densa ist durch Verankerungsfibrillen (Kollagen Typ VII) mit der Dermis verbunden. Beide Laminae, Fibrillen, dermale feine Kollagenfasern und Matrix bilden zusammen die lichtmikroskopisch sichtbare Basalmembran; diese entspricht der dermoepidermalen Junktionszone.

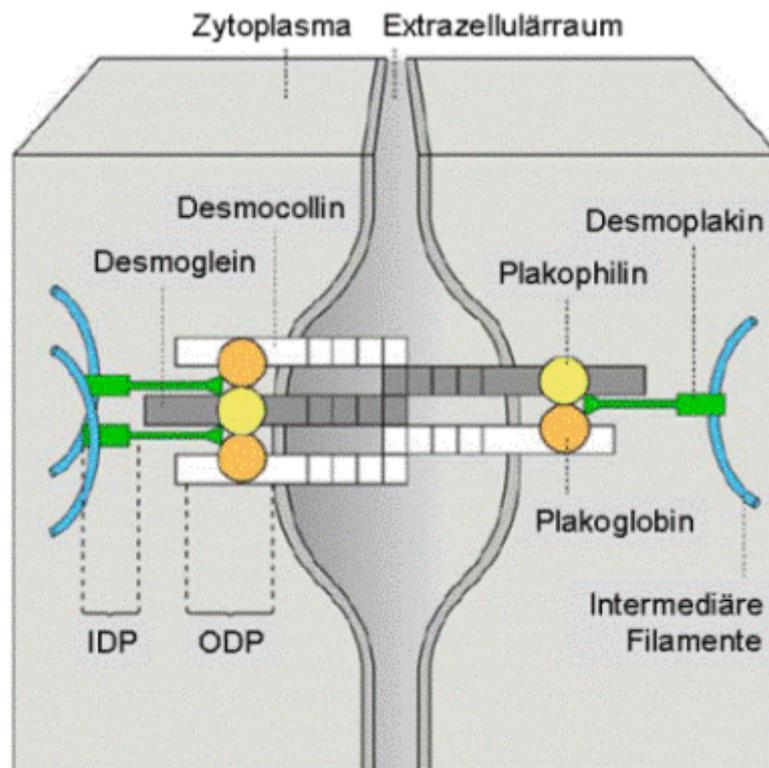
Im Bereich der dermoepidermalen Junktionszone kann es zur Blasenbildung kommen. Diese Blasenbildung ist häufig durch autoimmunologische Prozesse bedingt, wobei die bullösen Pemphigoid-Antigene BP180 (Kollagen XVII) und BP230, Laminine, Integrine und Kollagen VII als Zielantigene wirken (Moll et al., 1998; Borradori und Sonnenberg, 1999; Jung und Moll, 2003).

### **1.1.5 Desmosomen**

Als Desmosomen (Maculae adhaerentes) bezeichnet man Strukturen, über die die interzelluläre Adhäsion benachbarter Zellen zustande kommt (Green und Jones, 1996). In mehrschichtigem Plattenepithel sind die Desmosomen besonders gut ausgebildet, und ihre molekulare Komposition ist komplexer als die von Desmosomen in einfachen Epithelien. Auch kommen solche Desmosomen in

wenigen nicht-epithelialen Zelltypen vor, wie z.B. in Zellen des Myokards oder in dendritischen Retikulumzellen von Lymphfollikeln (Moll et al., 1998).

Schematisch ist die Struktur der Desmosomen in Abb. 1.1 gezeigt:



**Abb. 1.1: Schematische Struktur eines Desmosoms**

Die desmosomalen Cadherine, Desmoglein und Desmocollin, vermitteln über ihre extrazellulären Anteile die Verbindung der Zellen untereinander. Ihre zytoplasmatischen Anteile sind direkt mit den intrazellulären Plaqueproteinen Plakoglobin und Plakophilin verbunden, welche den äußeren dichten Anteil des desmosomalen Plaques bilden (*outer dense plaque*, ODP). Diese sind wiederum über Desmoplakin, welches den inneren, weniger dichten Anteil des desmosomalen Plaques bildet (*inner dense plaque*, IDP) mit den intermediären Filamenten des Zytoskeletts verankert (nach Waschke, 2008).

Die prominenteste Struktur der Desmosomen ist der elektronendichte Plaque mit einem ungefähren Durchmesser von 0,5  $\mu\text{m}$ . Man kann diesen in zwei Teile unterteilen, und zwar in einen äußeren Teil, der elektronenmikroskopisch dichte

ter erscheint, und in einen inneren, weniger dicht erscheinenden Teil. An diesen inneren Teil binden die intermediären Filamente (in Epithelzellen Zytokeratin- oder Tonofilamente).

Der desmosomale Plaque besteht im wesentlichen aus Desmoplakin und Plakoglobin, zusätzlich kommen noch andere desmosomale Plaque-Proteine, wie Plakophilin, Envoplakin und Periplakin vor. Das Desmoplakin stellt den inneren, weniger dichten Teil des desmosomalen Plaques dar. An dieses Protein binden die intermediären Filamente (Moll et al., 1998; Hashimoto, 2003; Huber, 2003). Plakoglobin befindet sich im äußeren, elektronenmikroskopisch dichter erscheinenden Anteil des desmosomalen Plaques und ist mit den zytoplasmatischen Anteilen der desmosomalen Cadherine (1.1.6; 1.1.7) verbunden (Moll et al., 1998; Huber, 2003; Waschke, 2008) (Abb.1.1).

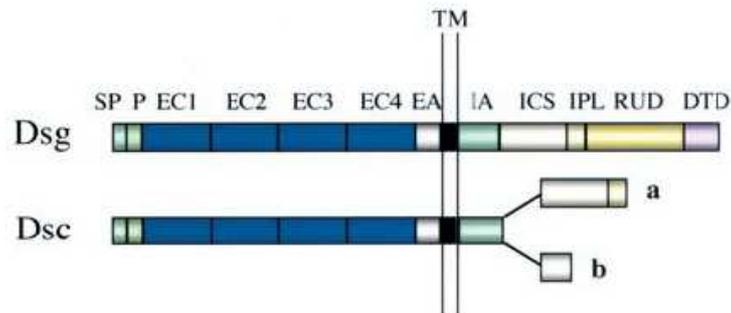
Für die interzelluläre Adhäsion sind Transmembranproteine, sogenannte desmosomale Cadherine, verantwortlich. Es handelt sich hierbei um Glykoproteine. Zu ihnen zählen die Desmogleine (Dsg 1,2,3 und 4) und die Desmocolline (Dsc 1, 2 und 3). Sie verfügen jeweils über einen zytoplasmatischen, transmembranösen und extrazellulären Anteil (Amagai, 1995a; Huber, 2003; Waschke, 2008). Der zytoplasmatische Anteil bildet zusammen mit dem Plakoglobin den äußeren, dichten Anteil des desmosomalen Plaques. Der extrazelluläre Anteil der desmosomalen Cadherine spielt eine entscheidende Rolle in der Vermittlung des Zellkontaktes, welcher in einer reißverschlußartigen Struktur aufgebaut ist (Moll et al., 1998). Der Interzellularspalt, der durch diese extrazellulären Anteile der desmosomalen Cadherine überbrückt wird, erscheint im Elektronenmikroskop hell und wird als Desmoglia bezeichnet; die Breite beträgt ungefähr 20-30 nm (Amagai, 1995a). Bei den desmosomalen Cadherinen handelt es sich um  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Strukturen (Windoffer et al., 2002). Dementsprechend verankern also Desmosomen einerseits das Zytoskelett aus intermediären Filamenten mit der Plasmamembran und sind gleichzeitig verantwortlich für die Verbindung der Zellen untereinander, was wichtig für die Stabilität des Gewebes ist (Moll et al., 1998).

Desmosomale Cadherine und auch Mitglieder der Plakin-Familie sind Autoantigene von verschiedenen bullösen Autoimmundermatosen. Durch ihre Schädigung kommt es zur Akantholyse und makroskopisch zur Blasenbildung. In dieser Arbeit wurden die Desmocolline als Autoantigene der Pemphigus-Erkrankung genauer untersucht.

### **1.1.6 Desmocolline**

Die Desmocolline (Dsc) gehören neben den Desmogleinen (Dsg) zur Familie der desmosomalen Cadherine; sie sind also Adhäsionsproteine, die für die Haftung von Keratinozyten untereinander verantwortlich sind. Die genetische Information für die Dsc wird auf dem Chromosom 18q12 codiert (Huber, 2003). Die Dsc verfügen über einen intrazellulären, transmembranösen und extrazellulären Anteil (Amagai, 1995a; Huber, 2003). Alle desmosomalen und klassischen Cadherine werden als inaktives Precursor-Protein mit einem Signalpeptid und einer Prosequenz exprimiert; die Prosequenz wird im weiteren Verlauf abgespalten (Amagai, 1995a). Die Dsc lassen sich in drei Untergruppen unterteilen, nämlich in Dsc1, 2 und 3. Das jeweilige molekulare Gewicht beträgt für Dsc1 130 kD, für Dsc2 115 kD und für Dsc3 110 kD (Waschke, 2008). Der zytoplasmatische Anteil von ihnen ist kurz; alle drei Dsc kommen in einer längeren „a“- und kürzeren „b“-Variante vor, was durch alternatives Splicen des gleichen Gens zustande kommt (Moll et al., 1998). Die a- und b-Formen unterscheiden sich nur im Hinblick auf ihr zytoplasmatisches COOH-Aminosäurende. Die kleinere b-Variante endet mit einer kurzen Aminosäuresequenz, die jeweils einzigartig für die entsprechende Unterform ist (z.B. sind es 11 Aminosäuren im Falle von Dsc1b). Die a-Varianten haben einen längeren COOH-Terminus (z.B. 65 Aminosäuren bei Dsc1a), welche Sequenz-Homologien zu klassischen Cadherinen aufweisen, wie z.B. dem E-cadherin. Die Sequenzelemente an den COOH-Termini der a-Formen sind für die Bindung von Plaque-Proteinen verantwortlich (Cheng et al., 2004).

Abb. 1.2 zeigt die Ultrastruktur der desmosomalen Cadherine Dsg und Dsc.



**Abb. 1.2: Ultrastruktur der Desmogleine und Desmocolline**

Die desmosomalen Cadherine Desmoglein und Desmocollin werden als Precursorproteine mit einem Signalpeptid (SP) und einem Propeptid (P) synthetisiert. Die extrazelluläre Domäne des „reifen“ Proteins besteht aus den extrazellulären Cadherin-Repeats (EC) und einer juxta-membranösen extrazellulären Anker-Domäne (EA). Der zytoplasmatische Anteil der Dsg kann aufgeteilt werden in eine intrazelluläre Anker-Domäne (IA), eine transmembranöse Domäne (TM), eine intrazelluläre cadherin-spezifische Domäne (ICS), einen intrazellulären Prolin-reichen Linker (IPL), eine sich wiederholende Einheitsdomäne (RUD) und eine C-terminale Desmoglein-spezifische Enddomäne (DTD). Dsc 'a' Varianten verfügen über kürzere zytoplasmatische Domänen, welche die IA-, ICS- und die IPL-Domäne enthalten. Die Dsc 'b' Formen zeigen nur eine partielle ICS-Domäne (aus Huber, 2003).

Die verschiedenen Dsc-Unterformen unterscheiden sich auch in ihrer Lokalisation in bestimmten Zelltypen und Schichten der Haut. Dsc2 wird in allen Geweben exprimiert, die Desmosomen bilden. Im Gegensatz dazu ist die Expression von Dsc1 und 3 auf Epithelien der Epidermis, des Ösophagus und der Cervix beschränkt; Dsc1 wird hier in den hochdifferenzierten, obersten Schichten gefunden, und Dsc3 tritt am meisten in den basalen und suprabasalen Schichten auf. Zwischen diesen Schichten verkleinert bzw. vergrößert sich die Verteilung von Dsc1 bzw. Dsc3 von der Oberfläche zu den basalen Zellen (Huber, 2003).

## 1.1.7 Weitere desmosomale Proteine

### 1.1.7.1 Desmogleine

Die Dsg gehören neben den Dsc zur Familie der desmosomalen Cadherine. Sie sind ebenso wie die Dsc  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Transmembranproteine, die für die

Verankerung von Zellen untereinander verantwortlich sind (Amagai et al., 1995c, Windoffer et al., 2002). Man unterscheidet hier zwischen vier Untergruppen, Dsg1, 2, 3 und 4 (Garrod et al., 1996; Bazzi et al., 2006).

Dsg1 hat ein Molekulargewicht von 160 kD und enthält einen relativ langen zytoplasmatischen Anteil, der sich in den desmosomalen Plaques erstreckt. Es kommt nur in mehrschichtigen Plattenepithelien vor (Moll et al., 1998). Es stellt das Autoantigen des Pemphigus foliaceus (PF) und des kutanen Pemphigus vulgaris (PV) dar (Emery et al., 1995; Ding et al., 1997; Amagai et al., 1999c).

Dsg2 hat ein Molekulargewicht von 116 kD; es enthält eine sehr große intrazelluläre Domäne und wurde bisher in allen Desmosomen-enthaltenden Geweben nachgewiesen (Schäfer et al., 1994; Moll et al., 1998).

Bei Dsg3 handelt es sich um ein 130 kD großes Protein; es kommt, wie auch das Dsg1, im wesentlichen nur in mehrschichtigen Plattenepithelien vor. Es stellt das Autoantigen des PV dar (Hashimoto et al., 1990; Amagai et al., 1991, 1996; Karpati et al., 1993). PV-Patienten mit alleinigem mukosalem Befall reagieren allein gegen Dsg3, bei PV-Patienten mit mukokutaner Manifestation sind Autoantikörper gegen Dsg3 und Dsg1 nachweisbar (Ding et al., 1997; Miyagawa et al., 1999; Amagai et al., 1999c).

Dsg4 (108kD) befindet sich in hochdifferenzierten Keratinozyten der menschlichen Epidermis und ist in Desmosomen nachweisbar, zudem wird es im Haarschaft und in der inneren Wurzelscheide des menschlichen Haarfollikels gefunden (Bazzi et al., 2006). Mutationen im Dsg4-Gen können eine kongenitale Hypotrichose verursachen (Shimomura et al., 2006).

### **1.1.7.2 Desmoplakine**

Das Desmoplakin I hat eine Größe von 250 kD und ist ein ausschließlich intrazellulär vorkommendes Plaque-Protein, das in Desmosomen vorhanden ist. Desmoplakin II ist eine kleinere Splice-Variante, die in bestimmten Epithelien, wie z.B. dem mehrschichtigem Plattenepithel vorkommt. Die Desmoplakine stellen den inneren, weniger dichten Anteil des desmosomalen Plaques dar und

sind für die Verankerung der intermediären Filamente des Zytoskeletts verantwortlich (Moll et al., 1998). Desmoplakin stellt ein Autoantigen des paraneoplastischen Pemphigus dar (Oursler et al., 1992).

### 1.1.7.3 Plakoglobin

Hierbei handelt es sich um ein Plaque-Protein der Armadillo-Familie mit einer Größe von 83 kD. Es kommt auch in nicht-desmosomalen Junctionen vor. In Desmosomen ist es mit den zytoplasmatischen Anteilen der desmosomalen Cadherine verankert (Moll et al., 1998).

## 1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem hat die Funktion, den Organismus vor Mikroorganismen, Fremd- und Schadstoffen, Toxinen und malignen Zellen zu schützen (Pezutto et al., 2007). Man teilt das Immunsystem in ein unspezifisches bzw. angeborenes System und ein spezifisches bzw. adaptives System ein. Des weiteren unterscheidet man noch zwischen der zellulär und der humoral vermittelten Immunität (Hof et al., 2005; Male, 2005).

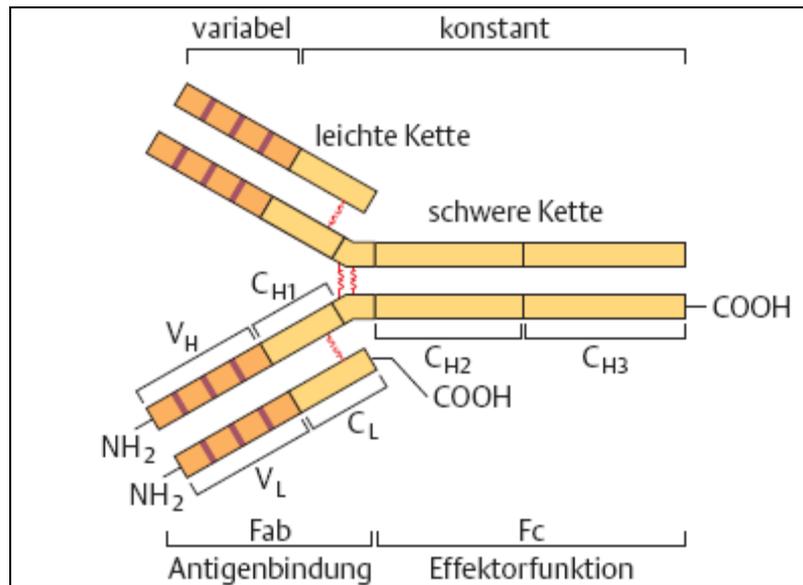
Die angeborene Immunität ist eine erste, schnelle Immunantwort und stellt einen relativ unspezifischen Abwehrmechanismus gegen infektiöse Erreger dar. Zu ihr zählen Granulozyten und das Monozyten-Makrophagen-System sowie auf humoraler Ebene das Komplementsystem, antimikrobielle Enzymsysteme und unspezifische Mediatoren wie Interferone und Interleukine. Die angeborene Immunität ist in der Lage, molekulare Muster zu erkennen, die mit Pathogenen assoziiert sind (sog. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs); hierbei handelt es sich um Aminosäuresequenzen, welche in der Regel in Mikroorganismen zu finden sind, jedoch im normalen Wirtsgewebe nicht vorkommen. Die Phagozyten verfügen über spezifische Muster-Erkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*; PRR), welche die PAMPs erkennen (Pezutto et al., 2007).

Die adaptive Immunantwort stellt eine langsamere Immunantwort dar, für die das spezifische Erkennen des Erregers notwendig ist (Hof et al., 2005); wesentliche Bestandteile der adaptiven Immunantwort sind die B- und T-Lymphozyten, welche in der Lage sind, hochspezifisch auf das jeweilige Antigen zu reagieren und daraufhin klonal zu expandieren. Dies ermöglicht eine effektive Immunantwort sowie eine Gedächtnisreaktion (Pezzutto et al., 2007). Im folgenden werden die Zellen der spezifischen Immunantwort genauer beschrieben.

### **1.2.1 Funktionen der Lymphozyten**

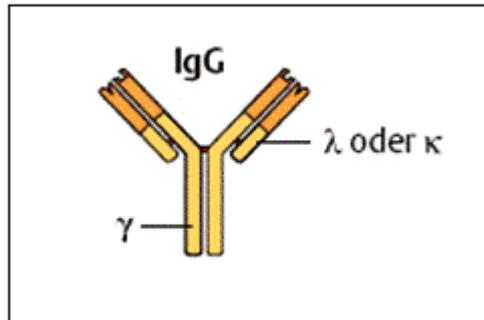
Lymphozyten sind die zellulären Träger der spezifischen Immunantwort; sie können Antigene spezifisch erkennen und daraufhin eliminieren.

B-Lymphozyten differenzieren im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen und sind verantwortlich für die humorale, das bedeutet die durch Antikörper vermittelte Immunität. Sie bilden zum Zweck der Antigenerkennung den B-Zell-Rezeptor aus, ein membranständiges Immunglobulin, welches lösliche Antigene erkennen und binden kann (Hof et al., 2005). Wenn die B-Zelle ihr spezifisches Antigen erkannt hat, vermehrt und differenziert sie sich zur Plasmazelle und sezerniert große Mengen ihres Rezeptormoleküls in Form von Antikörpern. Allerdings benötigt sie für ihre Differenzierung noch einen Kostimulus einer T-Helfer-2-Zelle (s.u.). Die von der B-Zelle sezernierten Antikörper sind in der Lage, an die antigenen Strukturen hochspezifisch zu binden und diese damit zu neutralisieren. Antigen-Antikörper-Komplexe können daraufhin, beispielsweise durch Komplementaktivierung, eliminiert werden. Die sezernierten Antikörper werden in verschiedene Klassen unterteilt (IgM, IgE, IgG, IgA und IgD) (Hof et al., 2005). In Abb. 1.3 ist die Grundstruktur eines Immunglobulins schematisch aufgezeichnet. Da für diese Arbeit sowohl die Immunglobuline der Klasse IgG als auch der Klasse IgA eine besondere Bedeutung haben, sind diese ebenfalls bildlich aufgeführt (Abb. 1.4).



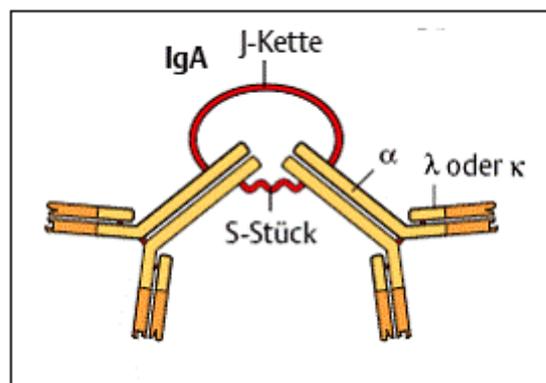
**Abb. 1.3 : Ultrastruktur eines Immunglobulins** (aus Hof et al., 2005)

Immunglobuline sind Glykoproteine, die aus zwei identischen Schwereketten sowie zwei identischen Leichtketten bestehen; die Leichtketten existieren in zwei verschiedenen Formen, kappa ( $\kappa$ ) und lambda ( $\lambda$ ). Die Ketten des Immunglobulins sind über Cystinreste miteinander verbunden. Es existieren zwei identische Fragmente, die Antigenbindungsfähigkeit besitzen (Fab = antigenbindendes Fragment), sowie das nicht-antigenbindende Fc-Fragment (Fc = kristallisierbares Fragment), auf dem sich Bindungsstellen für den Komplementfaktor C1q befinden. Sowohl die schwere als auch die leichte Kette zeichnen sich durch variable und konstante Domänen aus (V<sub>H</sub> = variable Domäne der schweren Kette; V<sub>L</sub> = variable Domäne der leichten Kette; C<sub>H/L</sub> = konstante Domäne der schweren/leichten Kette) (Hof et al., 2005; Pezzutto et al., 2007).



**Abb. 1.4a: Ultrastruktur eines IgG-Immunglobulins** (aus Hof et al., 2005)

IgG-Immunglobuline bilden den größten Anteil an Serum-Immunglobulinen; man unterscheidet vier verschiedene Subklassen (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), welche sich durch verschiedene gamma-( $\gamma$ )-Ketten unterscheiden. Sie entfalten ihre neutralisierende Wirkung im Blut selbst oder aufgrund ihrer hervorragenden Diffusionseigenschaften auch im infizierten Gewebe. Zudem spielen sie eine wichtige Rolle beim maternalen Schutz des Feten in der Gravidität, da sie durch die Plazenta in den kindlichen Blutkreislauf gelangen (Hof et al., 2005; Pezzuto et al., 2007).



**Abb. 1.4b: Ultrastruktur eines IgA-Immunglobulins** (aus Hof et al., 2005)

Die meisten IgA-Immunglobuline im Serum sind Monomere; sie kommen zu ca. 15% aber auch als Dimere vor und selten als Polymere. IgA-Dimere werden durch die J-Kette zusammengehalten. Man unterscheidet zwei verschiedene Subklassen, IgA1 und IgA2, welche sich in den Disulfidbrücken in der „Hinge“-Region unterscheiden. Sie dienen im menschlichen Organismus zum Schutz von Schleimhautoberflächen (Hof et al., 2005; Pezzutto et al., 2007).

T-Lymphozyten entwickeln sich im Thymus aus lymphoiden Vorläuferzellen des Knochenmarks und sind verantwortlich für die zellvermittelte Immunität. Sie verfügen über einen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR, *T cell receptor*) auf ihrer Oberfläche; hierbei handelt es sich um einen membranständigen Rezep-

tor, der nur kleine Bruchstücke eines Antigens erkennen kann und dies nur, wenn diese in den MHC-Molekülen (MHC = *major histocompatibility complex*) von antigenpräsentierenden Zellen (APC, *antigen presenting cells*) offeriert werden (Hof et al., 2005). Der genetische Aufbau des TCR wird für jede Zelle neu rekombiniert, so dass der Organismus über ein vielfältiges Repertoire an TCR verfügt. Bei den oben erwähnten MHC-Molekülen handelt es sich um sogenannte Transplantationsantigene, die auch als „humane Leukozyten Antigene“ (HLA; *human leucocyte antigen*) bezeichnet werden, obwohl sie letztendlich auf nahezu allen kernhaltigen Zellen detektiert werden können. MHC-Moleküle haben große Bedeutung für die T-Zell-vermittelte Immunantwort. Man unterscheidet zwischen MHC-Klasse-I-Molekülen, welche auf nahezu allen kernhaltigen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert werden, und MHC-Klasse-II-Molekülen, welche durch immunologisch relevante Zellen exprimiert werden, i.e. B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Über MHC-Klasse-I-Moleküle werden vorwiegend Antigene präsentiert, welche sich im Zytoplasma der jeweiligen Zelle befinden; hierdurch können beispielsweise virusinfizierte Zellen erkannt und eliminiert werden. MHC-Klasse-II-Moleküle dienen jedoch der Präsentation von Fremdsubstanzen und Erregern, die von der Zelle aus dem extrazellulären Raum aufgenommen wurden (Janeway et al., 2002; Hof et al., 2005).

T-Zellen tragen verschiedene Oberflächenmarker (CD, *cluster of differentiation*), anhand derer man sie unterscheiden kann. Alle T-Zellen sind Träger des Oberflächenmarkers CD3. Man unterscheidet zwischen CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen, welche man wiederum in CD4<sup>+</sup>-Th1-Zellen und CD4<sup>+</sup>-Th2-Zellen einteilen kann, CD8<sup>+</sup>-T-Effektorzellen sowie regulatorischen T-Zellen (Tr).

CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen erkennen Antigene, welche über MHC-II-Moleküle präsentiert werden. Die beiden Zelltypen der T-Helferzellen unterscheiden sich im wesentlichen durch ihr Zytokinprofil, welches sie sezernieren. Bei den Th-1-Zellen, welche als Regulatorzellen in Entzündungsreaktionen fungieren, dominiert die Ausscheidung von IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\beta$ , wohingegen Th-2-Zellen, welche als Differenzierungshilfe für B-Lymphozyten dienen (s.o.), vorwiegend IL-4, IL-6, IL-10 und den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  sezernieren. CD8<sup>+</sup>-T-Effektorzellen, die

man auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet, erkennen über MHC-I-Moleküle gebundene Antigene und stellen einen wichtigen Effektor der adaptiven Immunität dar, um Zellen zu zerstören, in deren Zytoplasma eine Vermehrung von Krankheitserregern stattfindet. Die regulatorischen T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation, der Modulation und der Supprimierung der Immunantwort (Janeway et al., 2002; Hof et al., 2005).

### 1.2.2 Toleranz und Autoimmunität

Die Aufgabe des Immunsystems ist die Identifikation und Eliminierung körperfremder Substanzen, wobei die Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen bewahrt werden muss. Unter Autoimmunität versteht man die Durchbrechung der Selbsttoleranz; sie beinhaltet die Reaktion des Immunsystems gegen körpereigenes Gewebe (Male, 2005).

Wie oben erwähnt entstehen im menschlichen Organismus T-Zellen mit vielfältigen Rezeptorstrukturen, unter denen auch Lymphozyten sind, die mit ihrem Antigenrezeptor körpereigene Strukturen erkennen; der Organismus hat jedoch verschiedene Strategien entwickelt, um diese zu inaktivieren. Hierbei unterscheidet man zwischen zentralen und peripheren Mechanismen. Autoreaktive T-Zell-Klone werden in der Regel frühzeitig im Thymus ausgeschaltet; es gibt zusätzlich noch vielfältige periphere Regulationsmechanismen, durch welche sie inaktiviert werden können (Pezzutto et al., 2007). Trotz dieser Regulationsmechanismen können jedoch autoimmun wirksame T-Zellen und Autoantikörper entstehen. Man geht davon aus, dass bestimmte Entzündungsvorgänge wie beispielsweise Infektionskrankheiten zu einer Aktivierung autoaggressiver T-Zellen führen können. Hierzu werden im folgenden die Prinzipien des „*molecular mimicry*“ und des „*Epitope Spreading*“ näher erläutert.

Unter „*molecular mimicry*“ versteht man die Bildung von Antikörpern und die Aktivierung von T-Zellen gegen menschliche Strukturproteine aufgrund deren Ähnlichkeit mit exogenen Antigenen oder neu generierten endogenen Antigenen. So können beispielsweise virale, bakterielle und pharmakologische Anti-

gene Immunreaktionen triggern, die ebenso gegen strukturell ähnliche Moleküle des menschlichen Körpers reagieren (Tchernev et al., 2006).

Das zweite Prinzip, das hier näher erläutert werden soll, ist das Prinzip des „*Epitope spreading*“; dieses kann man definieren als spezifische, autoreaktive Lymphozytenreaktion gegen endogene Epitope, die von den primären Epitopen, über welche die jeweilige Krankheit induziert wird, verschieden sind und die mit diesen nicht kreuzreaktiv sind. Diese endogenen Epitope werden erst durch die Autoimmunreaktion gegen die primären Epitope zugänglich. So können sie z.B. durch autoimmune oder inflammatorische Prozesse, die menschliches Gewebe zerstören, erst erreichbar werden und rufen daraufhin eine sekundäre Autoimmunantwort hervor. Man unterscheidet hier zwischen intramolekularem und intermolekularem *Epitope Spreading*, wobei sich ersteres innerhalb des selben Proteins vollzieht und sich letzteres auf unterschiedliche Proteine innerhalb des selben Gewebes oder Proteinkomplexes bezieht (Vanderlugt und Miller, 1996; Chan et al., 1998).

Zudem geht man davon aus, dass bei Autoimmunerkrankungen auch eine genetische Komponente beeinflussend wirkt; die entscheidende Rolle spielt hierbei das oben bereits erwähnte HLA-System (Janeway et al., 2002). Individuen mit bestimmten HLA-Konstellationen weisen eine höhere Empfänglichkeit für bestimmte Autoimmunerkrankungen auf. Dies konnte auch für die Pemphigus-Erkrankung nachgewiesen werden (siehe 1.3) (Sinha et al., 1988; Ahmed et al., 1990, 1991).

### 1.3 Pemphigus

Beim Pemphigus handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, die mit einer intraepidermalen Blasenbildung einhergeht (Amagai, 1999a; Robinson et al., 1999; Schmidt et al., 2000; Hertl und Schuler, 2002a). Die Inzidenz des Pemphigus vulgaris (PV), welcher die häufigste Form der Pemphigus-Erkrankungen darstellt, beträgt 0,1 bis 0,5 Neuerkrankungen pro Jahr bezogen auf 100.000 Einwohner, wobei eine höhere Erkrankungsrate in der jüdischen Bevölkerung beobachtet wird (Ahmed et al., 1990). In epidemiologischen Studien wurde herausgefunden, dass der PV mit bestimmten HLA-Klasse-II-Allelen assoziiert ist, nämlich HLA-DR $\beta$ 1\*0402, HLA-DR $\beta$ 1\*1401 (Ahmed et al., 1990, 1991) sowie HLA-DR $\beta$ 1\*0503 (Sinha et al., 1988).

Die Pemphigus-Erkrankung manifestiert sich im klinischen Bild durch schlaffe, intraepidermale Blasen und Erosionen der Haut und der Schleimhäute; histologisch findet sich eine Akantholyse, weiterhin lassen sich gebundene und zirkulierende Autoantikörper gegen Keratinozytenoberflächenkomponenten nachweisen. Die Autoantikörper richten sich in den meisten Fällen gegen die desmosomalen Strukturproteine (Beutner und Jordan, 1964; Karpati et al., 1993; Amagai, 1999a; Robinson et al., 1999). Anhand der Klinik und des Autoantikörperprofils kann man den Pemphigus in verschiedene Untergruppen unterteilen, welche im folgenden genauer erläutert werden. In Tab. 1.1 sind die verschiedenen Pemphigus-Entitäten mit ihren jeweiligen Zielantigenen aufgeführt.

**Tab. 1.1: Klassifikation der Pemphigus-Erkrankung** (nach Hertl und Schuler, 2002a; Hashimoto, 2003)

<b>Erkrankung</b>	<b>Zielantigen und Lokalisation</b>	
<b>Pemphigus vulgaris</b> (incl. P. vegetans)	Dsg3 Dsg1 Acetylcholin-Rezeptor	Desmosom Desmosom Keratinozyt
<b>Pemphigus foliaceus</b>	Dsg1	Desmosom
<b>IgA-Pemphigus</b> - SPD-Typ - IEN-Typ	Dsc1 Dsg1, Dsg3	Desmosom Desmosom
<b>Paraneoplastischer Pemphigus</b>	Dsg3 Dsg1 Periplakin Envoplakin Desmoplakin I/II BP230 HD1/Plektin 170 kD-Protein	Desmosom Desmosom Desmosom Desmosom Desmosom Hemidesmosom Hemidesmosom ?
<b>Arzneiinduzierter Pemphigus</b>	Dsg3 Dsg1	Desmosom Desmosom
<b>Pemphigus herpetiformis</b>	Dsg1 Dsg3	Desmosom Desmosom

### 1.3.1 Pemphigus vulgaris

Der Pemphigus vulgaris (PV) hat die höchste Inzidenz der Pemphigus-Erkrankungen. Bevorzugt betroffen sind Menschen im mittleren Lebensalter (30. – 60. Lebensjahr), in sehr seltenen Fällen erkranken Kinder; Frauen und Männer sind gleichermaßen betroffen (Jung und Moll, 2003).

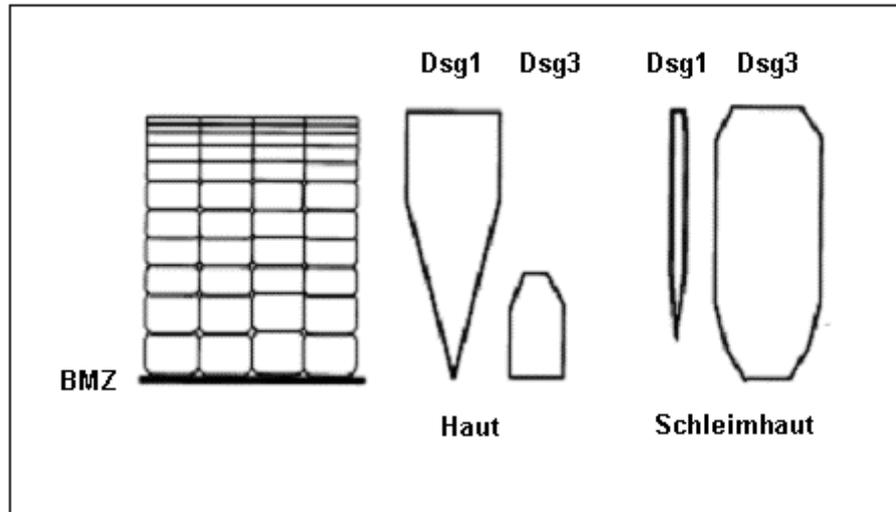
Klinisch zeigen sich beim PV schlaaffe Blasen mit klarem Inhalt auf normaler oder erythematöser Haut, die an beliebigen Körperstellen auftreten können. Aus diesen Blasen entstehen Erosionen und Krusten (Schmidt et al., 2000). Bei bis zu zwei Dritteln der Patienten ist anfangs die Mundschleimhaut betroffen (Ding et al., 1997). Die Krankheit kann auf die Mundschleimhaut beschränkt bleiben oder sich auf die Haut des Körpers ausbreiten. Beginnt die Erkrankung auf der Körperhaut, ist im weiteren Verlauf praktisch immer mit einer Beteiligung der Mundschleimhaut zu rechnen (Schmidt et al., 2000). Prinzipiell kann sich die Erkrankung auf dem gesamten Integument manifestieren, allerdings ist ein bevorzugter Befall des Rumpfes zu beobachten (Hertl, 2001). Die Reepithelialisierung einer solchen Läsion beginnt im Zentrum und erfolgt ohne Narbenbildung, allerdings kann eine Hyper- oder Hypopigmentierung bestehen bleiben (Jung und Moll, 2003). Die klinischen Zeichen Nikolski I und II sind beim Pemphigus positiv (Nikolski I: Blasen lassen sich durch seitlichen Schiebedruck auf gesunder Haut auslösen; Nikolski II: Stehende Blasen lassen sich durch seitlichen Druck verschieben) (Hertl und Schuler, 2002a; Jung und Moll, 2003).

Histologisch ist die Erkrankung charakterisiert durch einen intraepidermalen Verlust der Keratinozytenadhäsion, die sogenannte Akantholyse; man findet basale Keratinozyten am Boden der Blase, was auch als das sog. Grabsteinmuster bezeichnet wird. Typisch ist eine suprabasale Spaltbildung (Hertl und Schuler, 2002c). Die Dermis ist von Leukozyten infiltriert, der Tzanck-Test (bedeutet Nachweis einer Akantholyse im Blasengrundausrich) ist in der Exfoliativzytologie positiv (Jung und Moll, 2003).

In Seren von Patienten mit der PV-Erkrankung lassen sich Autoantikörper gegen das desmosomale Cadherin Dsg3 und in vielen Fällen auch gegen Dsg1 nachweisen (Hashimoto et al., 1990; Amagai et al., 1994; Ding et al., 1997; Ishii

et al., 1997; Harman et al., 2000; Matsuo et al., 2001; Hertl und Schuler, 2002b). Die Antikörperprofile richten sich danach, ob der Patient nur einen Mukosabefall vorweist oder ob sowohl die Mukosa als auch die Haut betroffen ist (Ding et al., 1997; Amagai et al., 1999c; Harman et al., 2000). Bei einem alleinigen Mukosabefall sind in der Regel nur Autoantikörper gegen Dsg3 nachweisbar; wenn zusätzlich zur Mukosa noch die Haut involviert ist, werden auch Autoantikörper gegen Dsg1 gebildet (Ding et al., 1997; Amagai et al., 1999c; Miyagawa et al., 1999). Man erklärte sich dieses Phänomen durch die Desmoglein-Kompensations-Theorie (Amagai, 1999a): Durch Immunfluoreszenz-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich Dsg3 nur in den unteren Schichten der Epidermis befindet (Amagai et al., 1996), wohingegen das Dsg1 in allen Epidermis-Schichten nachweisbar ist, aber bevorzugt in den oberflächlichen. In der Mukosa ist diese Anordnung anders: Hier ist Dsg3 in allen Schichten hoch exprimiert, wohingegen Dsg1 viel schwächer ausgebildet ist (Amagai, 1999a).

Die Desmoglein-Kompensations-Theorie besagt, dass sich Dsg3 und 1 in ihrer Adhäsionsfunktion gegenseitig kompensieren. Hat ein Patient Autoantikörper gegen Dsg3, so weist er in jedem Fall eine Blasenbildung der Mukosa auf, da Dsg1 hier nur wenig exprimiert ist und die Funktion des Dsg3 nicht kompensieren kann. Die Haut ist in diesem Fall gar nicht oder nur wenig betroffen, da das Dsg1 hier stark exprimiert ist und so die Funktion des Dsg3 kompensieren kann. Hat ein Patient Autoantikörper gegen Dsg1 und 3, ist sowohl die Funktion von Dsg1 als auch von Dsg3 gestört, woraus ein Befall sowohl der Schleimhäute als auch der Haut resultiert. Hieraus erklärt sich auch, warum Pemphigus foliaceus (PF)-Patienten, die charakteristischerweise anti-Dsg1-Autoantikörper bilden, vor allem eine oberflächliche Blasenbildung der Haut aufweisen (1.3.2) (Amagai, 1999a, Udey et al., 1999; Amagai, 2002).



**Abb. 1.5: Die Desmoglein-Kompensationstheorie**

Gezeigt wird die Verteilung von Dsg1 und Dsg3 in der Haut sowie in der Mukosa. In der Haut ist Dsg1 in allen Schichten ausgebildet, besonders stark allerdings in den apikalen. Dsg3 ist hier vor allem in den basalen Schichten nachweisbar. In der Mukosa zeigt sich nur eine schwache Dsg1-Expression, in den basalen Schichten ist es nicht nachweisbar; Dsg3 ist hier in allen Schichten stark ausgebildet. BMZ = Basalmembranzzone (nach Amagai, 1999a).

Das Konzept der Desmoglein-Kompensationstheorie wurde jedoch in jüngsten Studien kritisch diskutiert. Beispielsweise kann durch diese Theorie nicht erklärt werden, warum sich die Spaltbildung beim mukokutanen PV, bei dem Autoantikörper gegen Dsg3 und Dsg1 vorhanden sind, nur in der tiefen Epidermis befindet, wohingegen beim PF durch anti-Dsg1-Autoantikörper eine oberflächliche Blasenbildung getriggert wird. Zusätzlich wird in der Literatur auch von Pemphigus-Fällen berichtet, bei denen die Autoantikörperprofile nicht mit dem klinischen Phänotypen korrelieren. Zudem beruht die Desmoglein-Kompensationstheorie auf Untersuchungen in Maus-Modellen; in jüngsten Studien konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von Dsg1 und Dsg3 in Mäusen deutlich von der in Menschen unterscheidet (Amagai et al., 2006; Spindler et al., 2007).

Amagai et al. konnten zeigen, dass Autoantikörper gegen den NH<sub>2</sub>-terminalen Anteil des Dsg3 pathogen sind; die Arbeitsgruppe isolierte IgG-Autoantikörper aus PV-Seren und injizierte diese in Mäuse, welche daraufhin eine Blasenbildung zeigten (Amagai et al., 1992). Zudem konnten die pathogenen Antikörper

aus Patientenseren mittels Immunadsorption mit rekombinantem Dsg3-Protein eliminiert werden (Amagai et al., 1994; Memar et al., 1996). Ding et al. zeigten, dass auch IgG-Antikörper gegen Dsg1 in Seren von PV-Patienten pathogen sind (Ding et al., 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass die IgG-Antikörpertiter gegen die gesamte Ektodomäne von Dsg3 (Dsg3EC1-5) mit dem Schweregrad der klinischen Aktivität des Pemphigus korrelieren (Harmann et al., 2001; Müller et al., 2006; Müller et al., 2008). Des Weiteren konnten Müller et al. zeigen, dass Seren von PV-Patienten sowohl gegen konformationelle als auch nicht-konformationelle Epitope der Dsg3-Ektodomäne reagieren; sie führten zudem genaue Analysen der Reaktivitäten von PV-Patienten verschiedener Krankheitsstadien und klinischer Ausprägungen gegen die einzelnen extrazellulären Domänen von Dsg3 durch und konnten feststellen, dass IgG-Reaktivitäten gegen den NH<sub>2</sub>-Terminus (EC1) und gegen die EC2-4 von Dsg3 mit klinisch aktivem PV assoziiert waren. IgG-Reaktivitäten gegen EC1-4 waren bei PV-Patienten mit Mukosa-Befall nachweisbar und bei Patienten mit kutanem PV vermindert (Müller et al., 2008).

Die Autoantikörperproduktion im Pemphigus ist polyklonal; es sind vor allem Antikörper vom Typ IgG4 und IgG1 nachweisbar, wobei im akuten Stadium der Erkrankung vorzugsweise IgG4-Antikörper detektiert werden können (Bhol et al., 1995; Spaeth et al., 2001). Diese Antikörper sind plazentagängig; es wurden Fälle beschrieben, in denen Neugeborene durch transplazentare Übertragung der Antikörper einer an PV erkrankten Mutter für ein paar Wochen das klinische Erscheinungsbild eines Pemphigus entwickelten, das dann aber vollständig abheilte (Chowdhury und Natarajan, 1998; Campo-Voegeli et al., 2002).

Zusätzlich zu den Desmogleinen wurden zwei Acetylcholinrezeptoren, nämlich Pemphaxin und der  $\alpha 9$ -Acetylcholinrezeptor, als potentielle Autoantigene des Pemphigus beschrieben (Nguyen et al., 2000a, 2000b, 2000c). Cozzani et al. konnten zudem anti-Desmoplakin-Antikörper in Seren von Patienten mit PV detektieren (Cozzani et al., 2006). Zudem wurde in früheren Studien bei einzelnen PV-Patienten Reaktivität gegen Dsc von Rindern mittels Western Blot nachgewiesen (Dmochowski et al., 1993, 1995; Hashimoto et al., 1995b).

Der Mechanismus, der bei Pemphigus-Patienten zur Akantholyse führt, ist noch nicht genau bekannt. Es gibt verschiedene Theorien, wie genau die Akantholyse bei Pemphigus-Patienten zustande kommt, wobei hier einige vorgestellt werden sollen:

Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von IgG aus Pemphigus-Seren an Adhäsionsmoleküle der Keratinozyten zu einem schnellen, vorübergehenden intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg führt; demzufolge könnten bestimmte  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Signaltransduktionswege im Rahmen der Autoantikörperbindung an die Zelloberfläche verändert sein (Seishima et al., 1995). Des Weiteren wurde festgestellt, dass eine lokale Aktivierung von Proteasen wie Plasminogen-Aktivator und Phospholipase C stattfindet, die eine proteolytische Abspaltung des extrazellulären Anteils der Dsg verursachen können (Esaki et al., 1995; Schaefer et al., 1996; Kitajima et al., 1999). Auch wird vermutet, dass die Autoantikörper direkt die Bindung der Dsg stören (Amagai et al., 1991); dieser Mechanismus wurde auch als „steric hindrance“ bezeichnet (Sharma et al., 2007). Feliciani et al. konnten zeigen, dass die Bindung von Antikörpern bei Pemphigus-Patienten an Keratinozyten sowohl in vivo als auch in vitro zu einer Sekretion von Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 führt; für TNF- $\alpha$  konnte gezeigt werden, dass es an der Pathogenese der Akantholyse beteiligt ist, da der passive Transfer von IgG-Antikörpern aus Seren von Patienten mit Pemphigus-Erkrankung in Mäuse ohne TNF-Rezeptoren seltener zur Blasenbildung führt als bei „normalen“ Mäusen, welche die gewöhnlichen TNF-Rezeptoren ausgebildet haben (Feliciani et al., 2000). Caldelari et al. konnten zeigen, dass zumindest in vitro eine Bindung von Autoantikörpern an Dsg3 zu einer gestörten Verteilung von Plakoglobin, welches intrazellulär mit Dsg3 verbunden ist, an der Zellmembran führt; auch dies scheint eine entscheidende Rolle für den Mechanismus der Akantholyse zu spielen (Caldelari et al., 2001). Ferner scheint auch der programmierte Zelltod, die Apoptose, eine Bedeutung im Mechanismus der Akantholyse zu besitzen (Wang et al., 2004).

Im Rahmen der Pemphigus-Erkrankung wurden bereits intensive Forschungsanstrengungen betrieben, die sich mit der Rolle der T-Lymphozyten in dieser Autoimmunerkrankung beschäftigten. Wie oben bereits erwähnt, ist die Pem-

phigus-Erkrankung mit dem Vorkommen bestimmter MHC-Klasse-II-Allele assoziiert (Sinha et al., 1988; Ahmed et al., 1990, 1991); diese MHC-Klasse-II-Allele kommen auch in gesunden Personen vor. Hertl et al. konnten T-Zell-Antworten auf Dsg3 in PV-Patienten und in gesunden Kontrollpersonen, die entsprechende MHC-II-Allele trugen, nachweisen (Hertl et al., 1998a). Zudem konnte gezeigt werden, dass T-Zell-Antworten auf Dsg3 nicht nur bei den PV-assoziierten MHC-Klasse-II-Allelen nachweisbar sind, sondern auch bei bestimmten DR11-Allelen, welche sehr homolog zum DR $\beta$ 1\*0402-Allel sind, sowie beim HLA-DQ $\beta$ 1\*0301-Allel detektiert werden können (Hertl et al., 1998b). Bei den detektierten T-Zellen handelt es sich sowohl um T-Zellen vom Th<sub>1</sub>-, als auch vom Th<sub>2</sub>-Typ (Lin et al., 1997; Hertl et al., 1998a; Veldman et al., 2003; Veldman et al., 2004a). Patienten im akuten Krankheitsstadium zeichnen sich durch Autoantikörper aus, die vor allem zum IgG4-Untertyp gehören; diese Autoantikörper sind Th<sub>2</sub>-abhängig. Bei Patienten im chronischen Stadium der Erkrankung dominieren Antikörper der IgG1-Klasse, welche Th<sub>1</sub>-abhängig sind (Bhol et al., 1995; Spaeth et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass T-Zellen von PV-Patienten proliferieren, wenn ihnen antigene Peptide der extrazellulären Domäne von Dsg3 von APC präsentiert werden, und daraufhin Th<sub>2</sub>-Zytokine, wie IL-4, IL-6 und IL-10, sowie auch Th<sub>1</sub>-Zytokine, wie IFN- $\gamma$  sezernieren (Wucherpfennig et al., 1995; Lin et al., 1997; Hertl, 2000). Die bedeutenden peripheren T-Zell-Klone von PV-Patienten sind CD4<sup>+</sup>-Th-Zellen; diese autoreaktiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen scheinen autoreaktiven B-Zellen Hilfestellung für die Autoantikörper-Produktion zu geben (Lin et al., 1997; Hertl, 2000). Da sowohl bei PV-Patienten als auch bei gesunden Trägern der entscheidenden HLA-Typen autoaggressive T-Zellen gegen die extrazelluläre Domäne von Dsg3 nachgewiesen wurden, stellt sich die Frage, warum bei den gesunden Trägern B-Zell-Toleranz gegenüber Dsg3 herrscht und sie demzufolge nicht erkranken. Veldman et al. identifizierten Dsg3-spezifische, regulatorische T-Zellen (Tr), welche vor allem in gesunden HLA-Trägern detektiert werden konnten; diese Zellen sezernieren IL-10 und TGF- $\beta$  und inhibieren die Proliferation von Dsg3-spezifischen autoreaktiven T-Zell-Klonen und scheinen auf diese Art und Weise Bedeutung für die Erhaltung der Toleranz bei gesunden HLA-Trägern zu haben (Veldman et al., 2004b).

Zur Diagnosesicherung gibt es neben der klinischen Beurteilung verschiedene autoimmundiagnostische Methoden: Histologische Untersuchung, direkte Immunfluoreszenz, indirekte Immunfluoreszenz und immunserologische Tests mit Autoantigen-Extrakten bzw. rekombinanten Autoantigenen (Hertl und Schuler, 2002c). So kann man anhand der histopathologischen Präparate die intraepidermale Spaltbildung (Akantholyse) beobachten, welche sich aufgrund des Adhäsionsverlustes zwischen den epidermalen Keratinozyten manifestiert. Anhand der direkten Immunfluoreszenz der Haut und Mukosa lassen sich Gewebegebundene IgG-Antikörper (IgA-Antikörper im Falle des IgA-Pemphigus) nachweisen, welche sich netzartig zwischen den Zellen der Epidermis anordnen. Häufig sind diese Immunglobuline mit dem Komplementfaktor C3 vergesellschaftet. Für die indirekte Immunfluoreszenz wird im Falle des PV Affenösofagus als Substrat verwendet, hier zeigen sich interzelluläre IgG-Antikörper (Hertl, 2001; Hertl und Schuler, 2002c). In den letzten Jahren hat sich zunehmend die Diagnostik mit Western Blot und Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) durchgesetzt (Amagai et al., 1999b; Harman et al., 2000).

Therapeutisch wird der Pemphigus zunächst mit hohen Dosen systemischer Glukokortikoide behandelt; aufgrund der unerwünschten Nebenwirkungen versucht man, die Dosis der Glukokortikoide im Verlauf niedrig zu halten, indem man sie mit anderen Immunsuppressiva kombiniert. Als Immunsuppressivum der 1. Wahl gilt hier Azathioprin (Aberer et al., 1987). Ein ähnliches Wirkprofil wie Azathioprin weist Mycophenolat-Mofetil auf, welches in kleineren Gruppen von Patienten mit PV und PF erfolgreich eingesetzt wurde (Enk und Knop, 1999). Cyclophosphamid gilt als Mittel der Wahl bei therapierefraktärem Pemphigus; ebenso wird Chlorambucil bei schweren Krankheitsverläufen eingesetzt (Fleischli et al., 1999; Shah et al., 2000; Toth und Jonkmann, 2001). Neben den erwähnten immunsuppressiven Therapieansätzen existieren noch Strategien, die darauf abzielen, zirkulierende Autoantikörper zu entfernen. Hierzu zählt die Plasmapherese sowie auch die Immunadsorption; letztere hat den Vorteil, dass man mit ihr spezifisch Immunglobuline und Immunkomplexe entfernen kann und dabei die Eliminierung anderer Plasmaproteine verhindert (Eming und Hertl, 2006; Eming und Rech et al., 2006). Eine andere Therapieoption stellt die intra-

venöse Gabe von Immunglobulinen dar (Jolles, 2001). Wie bei anderen Erkrankungen gewinnt auch beim Pemphigus die Therapie mit monoklonalen Antikörpern entscheidende Bedeutung. Zu erwähnen ist hier Rituximab, welches ursprünglich für die Therapie von CD20+ B-Zell-Lymphomen eingesetzt wurde (Hertl et al., 2007; Eming et al., 2008). Die Wirksamkeit von Rituximab zusammen mit Immunadsorption konnte auch für die Therapie der Epidermolysis bullosa aquisata gezeigt werden (Niedermeier et al., 2007). Ebenso konnte die Wirksamkeit des Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ -Inhibitors Infliximab bei einem Patienten mit Therapie-refraktärem PV gezeigt werden (Jacobi et al., 2005).

### **1.3.1.1 Sonderformen des Pemphigus vulgaris**

Zu den seltenen Sonderformen des PV zählen der Pemphigus vegetans sowie der Pemphigus herpetiformis.

### **1.3.1.2 Pemphigus vegetans**

Diese seltene Pemphigus-Variante zeichnet sich dadurch aus, dass die Patienten schlaffe Blasen bilden, die schnell erodieren und am Blasengrund papillomatöse Wucherungen ausbilden, welche man auch als Vegetationen bezeichnet; die Läsionen können beim Eintrocknen einen warzenartigen Charakter annehmen (Jung und Moll, 2003). Prädilektionsstellen sind die intertriginösen Areale wie Axilla und Leistenbereich; relativ häufig ist auch eine Schleimhautbeteiligung. Man unterscheidet einen Typ Neumann und einen Typ Hallopeau, wobei der Typ Neumann durch einen aggressiveren Verlauf gekennzeichnet ist. Die Patienten weisen Autoantikörper gegen Dsg3 und Dsg1 auf (Hertl und Schuler, 2002a). Zudem berichten Hashimoto et al. in einer früheren Studie von zwei Patienten mit dem Typ Hallopeau des Pemphigus vegetans, die Reaktivität gegen Dsc vom Rind im Western Blot zeigten (Hashimoto et al., 1994).

### **1.3.1.3 Pemphigus herpetiformis**

Diese seltene Variante des PV zeichnet sich durch herpetiform gruppierte Bläschen aus; diese ähneln klinisch der Dermatitis herpetiformis (Santi et al., 1996;

Robinson et al., 1999; Hertl und Schuler, 2002a). Histologisch ist diese Erkrankung durch eine eosinophile Spongiose ohne deutliche Akantholyse gekennzeichnet; im Serum sind Autoantikörper gegen Dsg1 bzw. Dsg3 detektierbar (Hertl und Schuler, 2002a). Fraglich ist, warum sich diese Erkrankung klinisch so anders darstellt als der klassische Pemphigus, da beide Erkrankungen die gleichen Autoantikörperprofile aufweisen. Hier wird diskutiert, dass die Autoantikörper der beiden Pemphigus-Varianten verschiedene Epitope der Dsg erkennen könnten; so werden vielleicht im Pemphigus herpetiformis funktionell weniger bedeutende Epitope erkannt, so dass hier die Autoantikörper keine deutliche Blasenbildung triggern können, aber inflammatorische Prozesse induzieren, die zu einem interzellulären Ödem und einer eosinophilen Spongiose führen (Amagai, 1999a). In der Literatur wird ein Fall von Pemphigus herpetiformis beschrieben, bei dem neben Autoantikörpern gegen Dsg1 auch IgG-Autoantikörper gegen Dsc3 detektiert werden konnten (Kozłowska et al., 2003).

### **1.3.2 Pemphigus foliaceus**

Die PF-Erkrankung ist charakterisiert durch kleine schlaffe Blasen und schuppige, krustige und erythematöse Läsionen der Haut (Amagai et al., 1995b). Im Gegensatz zum PV bleiben die Schleimhäute unbeeinträchtigt (Matsuo et al., 2001). Betroffen sind vor allem die seborrhoeischen Körperareale (behaarte Kopfhaut, Gesicht, vordere und hintere Schweißrinne) (Hertl und Schuler, 2002a). Im histologischen Präparat sieht man, dass die Spaltbildung im oberflächlichen Anteil der Epidermis stattfindet, vor allem in dem Bereich, in dem sich das Stratum granulosum befindet (Amagai, 2002). Die Autoantikörper des PF richten sich gegen die extrazelluläre Domäne des Dsg1 (Emery et al., 1995), welches sich vor allem in den subkornealen Regionen der Haut befindet (Ding et al., 1999). Aufgrund dieser Tatsache ist erklärbar, warum PF-Patienten eher eine oberflächliche Spalt- und Blasenbildung aufweisen. Auch für den PF wurde nachgewiesen, dass die Antikörper, die gegen das Dsg1 gerichtet sind, pathogen sind (Amagai et al., 1995b). Transplazentärer Transfer der Anti-Dsg1-Antikörper einer Mutter auf ihr Kind induziert allerdings beim Kind in der Regel keine Blasenbildung. Amagai erklärte dies durch die Tatsache, dass bei Neu-

geborenen die Verteilung von Dsg3 in der Haut anders ist als bei Erwachsenen; bei Neugeborenen befindet es sich in der gesamten Epidermis und könnte somit, der Desmoglein-Kompensationstheorie zufolge, die Funktion des Dsg1 kompensieren (Amagai, 2002).

Dmochowski et al. berichteten von einem Fall von PF, bei dem IgG4-Autoantikörper gegen Dsc1a mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung von COS-7-Zellen und NIH 3T3-3 Zellen nachgewiesen werden konnten (Dmochowski et al., 1999); zudem konnte in früheren Studien bei einzelnen Fällen von PF-Patienten Reaktivität gegen bovine Dsc nachgewiesen werden (Dmochowski et al., 1993, 1995).

### **1.3.2.1 Sonderformen des Pemphigus foliaceus**

Hierzu zählen der in Südamerika endemisch vorkommende Fogo selvagem sowie der Pemphigus erythematosus (Senechal-Usher).

### **1.3.2.2 Fogo selvagem**

Eine Sonderform des PF stellt der sogenannte Fogo selvagem (FS; „Wildes Feuer“) dar, welcher in bestimmten Regionen Brasiliens endemisch ist. Das klinische Bild des FS ist dem des PF sehr ähnlich (Emery et al., 1995; Li et al., 2003). Auch hier sind im Patientenserum Autoantikörper gegen Dsg1 nachweisbar. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem Menschen mit einer bestimmten genetischen Prädisposition vermehrt an FS erkranken (Friedman et al., 1995); zusätzlich bestehen Anhaltspunkte, dass der Biss einer schwarzen Fliege der Gattung der Simuliidae mit dem Krankheitsgeschehen in Verbindung steht; hier wird diskutiert, ob der Speichel der schwarzen Fliege eventuell antigene Substanzen enthält, die mit epidermalen Antigenen kreuzreagieren (Friedmann et al., 1995). In einer früheren Studie konnte bei Patienten mit FS eine Reaktivität gegen Rinder-Dsc im Western Blot detektiert werden (Dmochowski et al., 1993).

### **1.3.2.3 Pemphigus erythematosus (Senear-Usher-Syndrom)**

Diese klinische Variante des PF ist charakterisiert durch scharf begrenzte, erythematöse, hyperkeratotische und schuppige Läsionen, die sich vor allem am Stamm und an lichtexponierten Arealen befinden (Schmidt et al., 2000; Hertl und Schuler, 2002a). Das klinische Bild hat somit Ähnlichkeit mit dem kutanen Lupus erythematosus. Im Serum sind Autoantikörper gegen Dsg1 sowie ggf. gegen andere desmosomale Antigene und oft antinukleäre Antikörper (ANAs) nachweisbar (Hertl und Schuler, 2002a).

### **1.3.3 IgA-Pemphigus**

Das klinische Erscheinungsbild des IgA-Pemphigus ist charakterisiert durch schlappe Bläschen oder Pusteln auf erythematöser oder normaler Haut; diese Pusteln tendieren dazu, kreisförmig zu konfluieren mit Krusten im zentralen Bereich. Prädilektionsstellen sind Axilla sowie die Leistengegend, auch Rumpf und die proximalen Extremitäten sind häufig mitbeteiligt; Schleimhäute sind nur selten betroffen. Die Patienten klagen häufig über Pruritus (Robinson et al., 1999). Die Erkrankung kann mit IgA-Gammopathien (sowohl maligne als auch benigne) sowie mit Gastrointestinalerkrankungen assoziiert sein (Wallach, 1992; Hertl und Schuler, 2002a; Kopp et al., 2006). Die meisten Fälle des IgA-Pemphigus haben einen chronischen, gutartigen, aber von Rückfällen gekennzeichneten Verlauf (Harmann et al., 1999). Interzelluläre IgA-Ablagerungen sind in der direkten Immunfluoreszenz in der Epidermis detektierbar; zirkulierende IgA-Antikörper finden sich bei ungefähr 50% der Patienten (Kim et al., 1996; Hertl und Schuler, 2002a). Histologisch zeigt sich eine intraepidermale Akantholyse mit starker Neutrophileninfiltration (Schmidt et al., 2000).

Man unterscheidet zwei Typen des IgA-Pemphigus, die subkorneale pustulöse Dermatitis (SPD-Typ) und die intraepidermale neutrophile Dermatitis (IEN-Typ) (Ebihara et al., 1991; Supapannachart et al., 1993; Hashimoto et al., 1996; Yasuda et al., 2000; Hashimoto et al., 2001; de Oliveira et al., 2003). Histopathologisch ist der SPD-Typ durch Pusteln charakterisiert, die sich in der oberen Epidermis befinden (Ishii et al., 2004); das Autoantigen ist Dsc1 (Hashimoto

et al., 1997); IgA-Ablagerungen sind vor allem an den Zelloberflächen der oberen Schichten der Epidermis detektierbar (Amagai, 1999a). Bei Patienten mit dem IEN-Typ können die Pusteln histopathologisch in der gesamten Epidermis detektiert werden; das Autoantigen ist noch nicht bekannt (Hashimoto et al., 2002; Ishii et al., 2004); IgA-Ablagerungen befinden sich in der gesamten Epidermis (Amagai, 1999a). Ishii et al. führten eine Studie zur Immunlokalisation der Zielautoantigene des IgA-Pemphigus durch; hierbei konnte gezeigt werden, dass die Autoantikörper des IEN-Typ mit Antigenen im Interzellularräum zwischen den Keratinozyten reagierten, und zwar nicht in den desmosomalen Bereichen, sondern in den extradesmosomalen Regionen der Zellmembranen der Keratinozyten. Deshalb wird diskutiert, ob es sich beim Zielantigen des IEN-Typs des IgA-Pemphigus möglicherweise um ein nicht-desmosomales transmembranöses Protein handelt (Ishii et al., 2004).

In der Literatur werden zusätzlich Fälle von IgA-Pemphigus beschrieben, in denen Patienten IgA-Autoantikörper gegen Dsg1 oder Dsg3 bildeten (Prost et al., 1991; Wang et al., 1997; Karpati et al., 2000; Hashimoto et al., 2001); demnach könnte der IgA-Pemphigus in vier Typen aufgeteilt werden: SPD-Typ (Dsc1 als Autoantigen), IEN-Typ (unbekanntes Autoantigen); PV-Typ (Dsg3 als Autoantigen) und PF-Typ (Dsg1 als Autoantigen) (Amagai, 1999a). Die Tatsache, dass kürzlich der Fall eines Patienten mit IgA-Pemphigus mit Autoantikörpern gegen Dsc1 und Dsg1 veröffentlicht wurde, wirft die Frage auf, ob es noch andere Entitäten der IgA-Pemphigus-Erkrankung gibt (Kopp et al., 2006).

#### **1.3.4 Paraneoplastischer Pemphigus**

Der PNP ist eine blasenbildende Erkrankung, die im Gefolge gutartiger wie auch bösartiger Geschwülste auftritt; sie ist in 84% der Fälle mit hämatologischen Neoplasien und Funktionsstörungen assoziiert (Kaplan et al., 2004; Tilakaratne et al., 2005). Die am häufigsten mit dem PNP assoziierten Erkrankungen, die bisher in der Literatur beschrieben wurden, sind folgende (in absteigender Reihenfolge):

- 1) non-Hodgkin-Lymphom (38,6%)

- 2) chronische lymphatische Leukämie (CLL) (18,4%)
- 3) Castleman Tumor (18,4%)
- 4) Thymom (maligne und benigne) (5,5%)
- 5) Waldenström-Krankheit (1,2%)
- 6) Hodgkin-Lymphom (0,6%)
- 7) Monoklonale Gammopathie (0,6%)

Nicht-hämatologische Neoplasien, die mit dem PNP assoziiert sind, machen einen Anteil von 16% aller Fälle aus; 8,6% sind Karzinome mit epitheliale Ursprung, 6,2% sind Sarkome mesenchymalen Ursprungs. Bisher wurde von einem Fall berichtet, bei dem der PNP mit dem malignen Melanom assoziiert war. Es sind seltene Fälle der Assoziation von PNP mit dem Adenokarzinom des Pankreas, des Kolons, der Brust und der Prostata beschrieben, sowie mit squamösen Zellkarzinomen der Zunge und der Vagina (Kaplan et al., 2004). In einem Drittel der Fälle wird die Neoplasie erst nach der Entwicklung des PNP gefunden (Coelho et al., 2005). Die Mortalitätsrate des PNP ist mit über 90% sehr hoch (Nousari et al., 1999; Preisz et al., 2004).

Das klinische Erscheinungsbild zeigt polymorphe Hautläsionen, die aus Blasen und Erosionen sowie multiformartigen, flächenhaften Erythemen mit Epidermolyse bestehen und den oberen Stamm und die proximalen Extremitäten befallen; auf den Handinnenflächen und Fußsohlen können sich lichenoide Effloreszenzen manifestieren (Robinson et al., 1999; Marzano et al., 2001; Hertl und Schuler, 2002a). Besonders charakteristisch ist für den PNP der hartnäckige und therapieresistente Befall der Mundschleimhaut (Anhalt et al., 1990; Fullerton et al., 1992); hier beobachtet man Ulzerationen und Erosionen des Oropharynx und einen für den PNP charakteristischen Befall des Lippenrots (Amagai et al., 1998).

Histologisch manifestiert sich das Bild der Erkrankung ebenso variabel wie das klinische Bild; häufig beobachtet werden eine suprabasale intraepitheliale Akan-

tholyse, Keratinozytennekrosen und eine vakuolige Degeneration der Basalmembranschicht (Anhalt et al., 1990, Schmidt et al., 2000). Autoantigene des PNP sind Proteine der Plakin-Familie, nämlich Periplakin, Envoplakin und Desmoplakin I/II, die desmosomalen Proteine Dsg1 und 3 sowie die hemidesmosomalen Adhäsionsmoleküle HD1/Plektin und BP230 sowie ein 170 kD schweres Transmembranmolekül, das noch nicht genauer identifiziert ist (Oursler et al., 1992; Hashimoto et al., 1995a; Amagai et al., 1998; Kiyokawa et al., 1998; Proby et al., 1999). Allerdings werden nicht alle diese Autoantigene von jedem PNP-Serum präzipitiert (Schmidt et al., 2000). Amagai et al. konnten zeigen, dass von 25 untersuchten PNP-Seren 25 IgG-Autoantikörper gegen Dsg3 enthielten; 16 waren positiv gegen Dsg1. Des Weiteren stellten sie fest, dass die Autoantikörper gegen Dsg3 pathogen sind, da sie in neonatalen Mäusen eine Blasenbildung induzierten (Amagai et al., 1998). Die Tatsache, dass es sich bei den Proteinen der Plakin-Familie um zytoplasmatische Proteine handelt, wirft die Frage auf, wie diese dem Immunsystem eigentlich „versteckten“ Proteine eine Immunantwort hervorrufen können. Möglich ist, nach dem molekularen Mechanismus des *Epitope Spreading*, dass die Anti-Dsg-Autoantikörper zunächst Schäden an den Zellmembranen verursachen, woraufhin die intrazellulären Strukturen erst immunologisch zugänglich werden und anti-Plakin-Autoantikörper ihre Zielantigene binden können (Amagai, 1999a; Proby et al., 1999). Die pathophysiologische Relevanz der anti-Plakin-Autoantikörper ist noch nicht geklärt; möglicherweise induzieren diese Gewebereaktionen, die für den PNP spezifisch sind und im PV nicht beobachtet werden, wie beispielsweise die Keratinozytennekrose (Amagai et al., 1999a). Für diese Arbeit ist von Bedeutung, dass bei Fällen von Patienten mit PNP auch Autoantikörper gegen Dsc nachgewiesen wurden (Hisamatsu et al., 2004; Preisz et al., 2004).

Der Mechanismus der Entstehung des PNP ist nicht hinreichend geklärt; möglich ist, dass die jeweiligen Tumoren Epitope präsentieren, die den Epitopen der desmosomalen Proteine und der Proteine der Plakin-Familie ähneln. Im Sinne des *Antigen Mimicry* könnten diese Epitope eine primäre Immunantwort hervorrufen, deren Antikörper gegen die desmosomalen bzw. Plakin-Strukturen kreuzreagieren. Beispielsweise ist bekannt, dass Desmoplakine in Thymomen und

Castleman-Tumoren exprimiert werden; dem gegenüber steht allerdings, dass die meisten der PNP-Patienten als Grundleiden ein Lymphom oder eine chronische B-Zell-Leukämie haben; es ist generell akzeptiert, dass diese Tumorzellen keine Desmosomen bilden oder Desmoplakine exprimieren (Oursler et al., 1992). Trotzdem gibt es in der Literatur Evidenz dafür, dass Desmosomen und desmosomen-ähnliche Strukturen von Tumoren gebildet werden können; desmosomen-ähnliche Strukturen wurden beispielsweise bei Sarkomen, Lymphomen, Neuroblastomen und Meningeomen detektiert; Desmoplakine waren in reaktiven Lymphknoten, Tonsillen, Non-Hodgkin-B-Zell-Lymphomen und synovialen Sarkomen nachweisbar (Oursler et al., 1992). Demzufolge könnten die Tumoren Antigene produzieren, die mit den epithelialen Antigenen kreuzreagieren, woraufhin die gebildeten Autoantikörper die mukokutane Erkrankung des PNP induzieren (Oursler et al., 1992).

Im Rahmen des PNP können auch schwerwiegende Lungenerkrankungen auftreten, was bisher bei keiner anderen Pemphigus-Erkrankung beobachtet wurde. So berichten beispielsweise Nousari et al. von zwei Patienten, die im Rahmen eines PNP an Dyspnoe litten; in der endobronchialen Biopsie konnte eine Akantholyse nachgewiesen werden; möglicherweise verursachen die Autoantikörper gegen Proteine der Plakin-Familie die Akantholyse im Bronchialepithel (Nousari et al., 1999). Fullerton et al. berichten über einen Patienten, der ebenfalls im Rahmen eines PNP an Dyspnoe litt und bei dem im Lungengewebe IgG-Ablagerungen in den Interzellularräumen nachgewiesen werden konnten, die identisch zu denen in der Haut waren (Fullerton et al., 1992). Zudem konnte gezeigt werden, dass Autoantikörper aus PNP-Seren auch gegen verschiedene andere Gewebe gerichtet sind, wie z.B. gegen Epithelien der gastrointestinalen Mukosa und Harnblase, sowie auch gegen nicht-epitheliale Gewebe wie beispielsweise Myokard, Niere und Leber (Oursler et al., 1992).

Es wird kontrovers diskutiert, ob bestimmte Chemotherapeutika oder andere therapeutische Maßnahmen die Manifestation des PNP triggern können. Fried et al. berichten von einem Fall von PNP, der nach palliativer Strahlentherapie auftrat (Fried et al., 1993); Goptu et al. führen drei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie an, die innerhalb einer Woche nach Beendigung einer

Therapie mit Fludarabin an einem PNP erkrankten (Gooptu et al., 2001); in einer Studie von Preisz et al. wird über einen Ausbruch von PNP berichtet, der in eventuellem Zusammenhang mit einer Therapie mit Cyclophosphamid stand (Preiz et al., 2004). Bisher wird kontrovers diskutiert, ob tatsächlich die jeweiligen Therapien den PNP getriggert haben. Es wird diskutiert, ob beispielsweise Zytostatika wie Cyclophosphamid Tumorantigene „sichtbar“ und „zugänglich“ machen, und dadurch eine Antikörper-Produktion gegen die Tumorzellen induzieren, welche mit kutanen Epitopen kreuzreagieren (Anhalt, 1997; Preisz et al., 2004). Bei der Betrachtung von über 140 PNP-Fällen zeichnet sich bisher aber keine eindeutige Assoziation von Chemotherapeutika und der Induktion des PNP ab (Anhalt, 2001).

Diagnostisch wird zur Detektion des PNP die indirekte Immunfluoreszenz mit Rattenblasenepithel verwendet (Liu et al., 1993), in der direkten Immunfluoreszenz detektiert man interzellulär und an der dermoepidermalen Junktionszone IgG und C3 (Hertl und Schuler, 2002c).

Abschließend sollen hier noch zusammenfassend die fünf wichtigsten Kriterien des PNP aufgeführt werden: 1) Polymorphe mukokutane Erosionen; 2) intraepidermale Akantholyse, Keratinozytennekrosen und vakuolige Degeneration der Basalmembranschicht; 3) Nachweis von IgG und C3 interzellulär und an der Basalmembranzone in der direkten IF; 4) Serum-Antikörper, die auf Affenösophagus und Rattenblasenepithel binden, und 5) Immunpräzipitation eines Proteinkomplexes, der Desmoplakin I/II, Envoplakin, Periplakin, das noch nicht genauer differenzierte 170kD-Protein, HD1/Plektin, BP230, Dsg1 und Dsg3 umfassen kann (Bowen et al., 2000; Schmidt et al., 2000).

### **1.3.5 Medikamentös induzierter Pemphigus**

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Pemphigus-Varianten wird in der Literatur auch ein medikamentös induzierter Pemphigus beschrieben, welcher meistens durch eine Therapie mit Arzneien getriggert wird, die Thiol- oder Schwefelgruppen enthalten. Zu den Pemphigus auslösenden Medikamenten zählen D-Penicillamin, Captopril, Propranolol, Indomethazin, Phenylbutazon, Pyridinol,

Piroxicam und Tuberkulostatika (Huilgol et al., 1995, Brenner et al., 1997). Ebenfalls wurde die Induktion eines Pemphigus durch Arzneimittel nach Langzeittherapie mit Interleukin-2 oder Interferon- $\gamma$  beobachtet (Hertl und Schuler, 2002a). Auch werden andere Faktoren, wie z.B. physikalische Einwirkungen wie Verbrennungen, operative Eingriffe, UV- und PUVA-Therapie sowie Röntgenbestrahlung oder Hautkontakte mit chemischen Substanzen, wie z.B. Pestiziden, oder der Verzehr von Lebensmitteln mit SH-haltigen Gruppen als Auslöser der Pemphigus-Erkrankung diskutiert (Schmidt et al., 2000). Die Autoantikörper richten sich in der Regel gegen Dsg3 und/oder Dsg1 (Brenner et al., 1997). Das klinische Bild ähnelt meistens dem PF, kann aber auch wie der PV, Pemphigus herpetiformis oder Pemphigus erythematosus aussehen (Hertl, 2001).

#### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Es ist bekannt, dass Dsg, die zu den desmosomalen Cadherinen zählen, entscheidende Zielautoantigene der Pemphigus-Erkrankung sind. Neben den Dsg stellen die Dsc die zweite Gruppe der desmosomalen Cadherine dar; über ihre Rolle als Autoantigene von bullösen Autoimmundermatosen ist weitaus weniger bekannt. In Japan wurde eine Studie durchgeführt, in der Patienten mit verschiedenen Pemphigus-Erkrankungen auf das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen Dsc untersucht wurden (Hisamatsu et al., 2004). Hier konnte gezeigt werden, dass Patienten mit dem „klassischen“ PV keine Reaktivität gegen Dsc zeigen, aber dass in Fällen von PNP, IgA-Pemphigus und atypischem (i.e. klinisch polymorphem) Pemphigus Autoantikörper gegen Dsc nachgewiesen werden können. Bisher wurde noch keine größere Studie mit europäischen Pemphigus-Patienten durchgeführt, um die Rolle der Dsc als Autoantigene in dieser Region zu erfassen. Dieses zu untersuchen war das Ziel dieser Arbeit. Daraus ergeben sich als Übersicht folgende Ziele:

- Produktion der rekombinanten Proteine Dsc1, 2 und 3 im Baculovirus-Expressionssystem

- Etablierung eines ELISAs zur Testung von Seren von Patienten mit klassischem Pemphigus auf IgG-Reaktivität sowie Seren von Patienten mit atypischen Pemphigus-Erkrankungen auf IgG- und IgA-Reaktivität gegen Dsc1, 2 und 3
- Charakterisierung des Autoantikörperprofils von Patienten mit klassischem Pemphigus und atypischen Pemphigus-Erkrankungen gegen die extrazellulären Domänen von Dsc1-3
- Untersuchung spezifischer Patientenserum mittels Western Blot-Analyse

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Das Baculovirus-Expressionssystem

Zunächst mussten die rekombinanten Dsc hergestellt werden; dafür machten wir uns das Baculovirus-Expressionssystem (BEVS, *Baculovirus Expression Vector System*, BD Biosciences, Heidelberg) zunutze, ein eukaryotisches System, welches die Möglichkeit bietet, rekombinante Proteine in Insektenzellen zu exprimieren und diese aufzureinigen.

Im Baculovirus-Expressionssystem wird ein spezielles Baculovirus, nämlich das *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV)* verwendet. Dieses Virus ist ausschließlich insektenpathogen und befällt mehr als 30 verschiedene Insektenspezies aus der Gattung der Lepidoptera. Die Infektion der Wirtszelle erfolgt durch erleichterte Endozytose bzw. durch Fusion mit der Zellmembran. Für diese Arbeit wurden u.a. *Spodoptera frugiperda* (SF)-Zellen verwendet, und zwar speziell SF-21-Zellen, welche besonders permissiv für das *AcNP-Virus* sind.

Bei Baculoviren handelt es sich um doppelsträngige DNA-Viren; in das Genom der Baculoviren können heterologe Gene mittels eines Transfervektors eingeschleust werden. Der verwendete Transfervektor enthält Endsequenzen, die homolog zu Sequenzen der verwendeten Baculovirus-DNA sind, so dass sie später gezielt in dieses Genom eingebaut werden. Durch Rekombination und Selektion werden dann infektiöse Viren mit eingebautem Fremdgen erhalten. Für diese Arbeit wurde *Baculo-Gold-Bright-Virus-DNA* verwendet.

Um Baculoviren zur Proteinexpression zu verwenden, wurden als Wirtszellen Zellkulturen der Species *Spodoptera frugiperda* und *Trichoplusia ni* verwendet, die zu den Lepidoptera-Arten gehören.

Vorteil dieses eukaryotischen Systems, wie es beim Baculovirus-Expressionssystem der Fall ist, gegenüber einem prokaryotischem System ist die Tatsache, dass im eukaryotischen System die Proteine posttranslational modifiziert werden, so dass sie sich in ihrer dreidimensionalen Struktur, ihrer

Funktion und ihrer immunologischen Reaktivität von dem Protein der eukaryotischen Ursprungszelle nur wenig unterscheiden. Solche posttranslationalen Modifikationen umfassen beispielsweise die Glykosilierung und Phosphorylierung der Proteine (BD Biosciences, Heidelberg, 1999).

## **2.2 Verwendetes rekombinantes Protein**

Die rekombinanten Dsc, die für diese Arbeit verwendet wurden, wurden im Baculovirus-System exprimiert. Die Vektoren, die die Sequenzen der rekombinanten Dsc enthielten, wurden freundlicherweise von Prof. Hashimoto, Kurume Universität, zur Verfügung gestellt; sie wurden von Dr. Ralf Müller mit linearisierter Baculovirus-DNA (*Baculo-Gold-Bright-Virus-DNA*, BD Biosciences, Heidelberg) in SF-21-Zellen kotransfiziert. Anschließend wurden die Viren in SF-21-Zellen amplifiziert, bis ein für die Proteinproduktion ausreichender Titer erreicht wurde.

Die rekombinanten Dsc entsprechen der extrazellulären Domäne der Dsc (Dsc1, 2 und 3 bestehen jeweils aus 5 ähnlichen, extrazellulären Domänen, 1.1.6), enthalten N-terminal eine Signalsequenz und ein Propeptid und am COOH-Terminus einen E-Tag und einen His-Tag (Abb.3.2a). Der E-Tag dient zum Nachweis der Proteine mittels eines Anti-E-Tag-Antikörpers im ELISA oder im Western Blot. Der His-Tag enthält sechs Histidin-Reste, über welche die Proteine mittels Nickelagarose-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden können (2.5; 2.6).

## **2.3 Insektenzellkultur**

Für die Amplifikation der Baculoviren und für die Proteinproduktion war es nötig, Insektenzellen zu kultivieren. In dieser Arbeit wurden Zelllinien der Lepidoptera Arten *Spodoptera frugiperda* (SF-21, Invitrogen, Karlsruhe) für die Virusamplifikation und *Trichoplusia ni* (High-Five, Invitrogen) für die Herstellung der rekombinanten Proteine verwendet.

Die Zellen wurden zu  $1 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  in  $175 \text{ cm}^2$ -Kulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) mit 30 ml Medium ausgesäht und in Adhärenz für zwei bis drei Ta-

ge bei 27°C im Wärmeschrank kultiviert. Die High-Five-Zellen haben eine Verdopplungszeit von 18h, bei den SF-21-Zellen beträgt die Verdopplungszeit 24h. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Zellen gesplittet und mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausgesät. Die Kultivierung der Zellen wurde unter der Sterilwerkbank durchgeführt.

Medien und Zusätze, die für die Kultivierung der Insektenzellen verwendet wurden:

SF21: Grace's Insect Medium, Supplemented (Invitrogen)  
+ Penicillin/Streptomycin 1:100 (Invitrogen)  
+ hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum 10% (FCS, *fetal calf serum*) (PAA, Cölbe)

High Five: SF 900 II SFM (serum free media) (Invitrogen)  
+ Penicillin/ Streptomycin 1:100 (Invitrogen)

## 2.4 Virusamplifikation

Um die Insektenzellen optimal zu infizieren, wurde zunächst die vorhandene Baculovirus-Stammlösung zu einer hochtitrigen Viruslösung amplifiziert. Dafür wurden Insektenzellen der Lepidoptera-Spezies *Spodoptera frugiperda* (Zelllinie SF-21, Invitrogen) mit Baculovirusüberstand infiziert. Zu beachten ist hierbei, dass das Verhältnis von Viren zu Insektenzellen  $<1$  gewählt wird, so dass jede Insektenzelle von höchstens einem Virus infiziert wird. Das Verhältnis von Viren zu Insektenzellen bezeichnet man als MOI (*multiplicity of infection*). Die MOI berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{MOI} = \frac{\text{Viruslösung (ml)} \times \text{Virustiter (pfu/ml)}}{\text{Zellzahl}}$$

Die MOI sollte  $< 1$  gewählt werden, um eine Rückrekombination der transfizierten Baculoviren zum Wildtyp zu vermeiden.

Die Virusamplifikation erfolgte zuerst in  $25 \text{ cm}^2$ -Kulturflaschen (Nunc) mit ungefähr  $1,5 \times 10^6$  Zellen und schließlich in  $175 \text{ cm}^2$ -Kulturflaschen mit ungefähr

$30 \times 10^6$  Zellen. Es wurden ca.  $30 \times 10^6$  SF-21-Zellen in einer 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche ausgesät. Dabei sollten die Zellen zu 60-70% konfluent sein. Auf die adhärennten Zellen wurde 10 ml Kulturmedium mit einer entsprechenden Menge an Virus gegeben, dass sich eine MOI < 1 ergab. Die infizierten Zellen wurden bei RT für ca. 60 min inkubiert. Da eine gleichmäßige Verteilung der Viren auf die Insektenzellen gewährleistet sein sollte, wurde die Flasche während der Inkubationszeit regelmäßig geschwenkt. Anschließend wurde 20 ml neues Medium pro Kulturflasche zugegeben und die Zellen für weitere sieben Tage bei 27 °C inkubiert.

Bei erfolgreicher Infektion zeigte sich bereits nach zwei bis drei Tagen ein zytopathologischer Effekt: Die Insektenzellen waren stark aufgetrieben und wiesen vergrößerte Kerne auf, was man unter dem Lichtmikroskop beobachten konnte (Abb. 3.1a). Zudem zeigte sich ein starker Adhäsionsverlust. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte man bei gut infizierten Zellen beobachten, dass sie grün leuchteten. Dies geschieht aufgrund der Tatsache, dass durch das *Baculo Gold Bright Virus* ein grün fluoreszierendes Protein (GFP, *green fluorescent protein*) koexprimiert wird, welches die infizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop grün leuchten lässt (Abb. 3.1b).

Um das Virus schließlich zu gewinnen, wurde nach der Inkubation von sieben Tagen der Überstand aus der Flasche entnommen und die Zellen durch eine Zentrifugation von 10 min bei 3350 g entfernt. Daraufhin wurden die Virusüberstände mehrerer Kulturflaschen vereinigt und bei 4 °C unter Lichtschutz gelagert.

## **2.5 Produktion der rekombinanten Desmocolline**

Für die Proteinproduktion wurden Insektenzellen der Lepidoptera-Art *Trichoplusia ni* (High-Five, Invitrogen) verwendet. Hierfür wurden ungefähr  $30 \times 10^6$  Zellen in einer 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche in 10 ml Medium ausgesät. Nachdem die Zellen in die Adhärenz gegangen waren, nahm man den Überstand ab und verwarf ihn. Daraufhin wurden die Insektenzellen in 10 ml Medium mit Baculoviren mit einer MOI ungefähr gleich 10 infiziert. In diesem Falle konnte die MOI so hoch gewählt werden, weil die gewonnenen Kulturüberstände nicht zur Infektion neu-

er Zellen verwertet wurden; durch diese höhere MOI erhöhte sich auch die Wahrscheinlichkeit, dass jede Insektenzelle infiziert wurde.

Die infizierten Zellen ließ man dann ungefähr 60 min inkubieren; dabei mussten die Kulturflaschen regelmäßig geschwenkt werden, um eine gleichmäßige Verteilung der Baculoviren zu gewährleisten. Nach dieser Infektionszeit wurden weitere 20 ml frisches Medium zu den Zellen gegeben. Daraufhin ließ man die Zellen in den Kulturflaschen mit 30 ml Medium für drei Tage bei 27°C im Inkubator stehen. Danach wurden die Kulturüberstände abgenommen und für 10 min bei 4°C und 3350 g zentrifugiert.

Um größere Mengen an Protein zu produzieren, wurden alternativ Rollerflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen; 2000 ml) mit  $1-2 \times 10^6$  Zellen pro ml Medium verwendet, die insgesamt mit einem Volumen von 300 ml Medium befüllt wurden. Die Infektion mit Baculovirus erfolgte wie oben beschrieben. Die Insektenzellen wurden dann für drei Tage unter ständiger Rotation in Rollerflaschen inkubiert, danach wurde ebenfalls die Virussuspension abgenommen und in 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Nunc) für 10 min bei 4°C und 3350 g zentrifugiert. Die proteinhaltigen Überstände wurden dann direkt weiterverwendet oder bis zur Proteinaufreinigung bei 4°C gelagert.

## 2.6 Proteinaufreinigung

Das Protein wurde mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt; hierbei macht man sich die Affinität des Proteins zu einer bestimmten Substanz zunutze. Das hier benutzte rekombinante Protein verfügt über einen sechsfachen Histidinrest, den sogenannten sechsfachen His-Tag; dieser Histidinrest weist eine hohe Affinität zu Nickel auf. Die rekombinanten Proteine wurden in der Nickelagarose über ihre Histidinreste an NTA (*nitrilo-tri-acetic acid*)-ligierte Nickelionen ( $\text{Ni}^{2+}$ ) gebunden. Das Protein war so in einer Propylen-Säule durch Agarose zurückgehalten und wurde mit Hilfe eines speziellen Puffers eluiert. Dieser Elutionspuffer enthält Imidazol, welches eine höhere Affinität zu Nickel hat als das Histidin und somit die an die Histidinreste gekoppelten rekombinanten Proteine aus der Bindung mit der Nickelmatrix verdrängt.

Der proteinhaltige Überstand wurde zunächst in Dialyseschläuche (Pierce, Rockford, USA) gefüllt; diese Dialyseschläuche zeichnen sich dadurch aus,

dass sie undurchlässig für Proteine ab einem bestimmten Molekulargewicht sind. Für die Aufreinigung der Dsc wurde der MWCO (*molecular weight cut off*) von >10kD gewählt. Die Proteine wurden dann in diesen Dialyseschläuchen bei 4°C gegen einfachen Bindungspuffer (5 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt) , pH 7,9) dialysiert. Die Dialyse erfolgte mit dreimaligem Pufferwechsel. Zuerst wurde für ca. sechs Stunden dialysiert, im zweiten Schritt über Nacht und am folgenden Tag ein drittes Mal für ca. zwei Stunden.

Die Vorbereitung des Nickelagarosegels wurde folgendermaßen durchgeführt: Pro 50 ml dialysiertem Proteinüberstand wurde 1 ml Nickelagarose-Suspension (Quiagen, Hilden) benötigt (1:2 in Bindungspuffer verdünnt). Diese Suspension wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Nunc) gefüllt und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand verworfen, es folgten zwei Waschschrirte mit je 50 ml sterilem aqua dest. Das aqua dest wurde auf die Nickelagarose gegeben, bei 300 g für 5 min zentrifugiert und die entstandenen Überstände wurden verworfen. Darauf folgten zwei weitere Waschschrirte mit einfachem Bindungspuffer. Das Sediment, das man hierbei erhielt, wurde schließlich mit Bindungspuffer auf das Volumen der eingesetzten Nickelagarose aufgefüllt.

Der dialysierte Kulturüberstand wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Nunc) gefüllt und mit je 1 ml der aufgereinigten Nickelagarose (1:2 verdünnt mit Bindungspuffer) versetzt. Diese Röhrchen wurden dann über Nacht bei 4°C unter Schwenkung inkubiert.

Am dritten Tag der Proteinproduktion wurde eine 10 ml-Polypropylen-Säule (Quiagen) mit einer Fritte versehen und mit Bindungspuffer gespült. Daraufhin wurde die Protein-Agarose-Suspension auf die Säule gegeben. Die Agarose wurde hierbei bis zur vollständigen Sedimentation mit der Fritte aufgefangen. Nachdem die komplette Suspension auf die Säule gegeben war, wurde diese noch mit 100 ml Einfach-Bindungspuffer gewaschen. Danach wurde das Protein, welches mittels des sechsfachen His-Tags an die Nickelagarose gebunden war, mittels Elutionspuffer (0,5 M Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck), pH=7.9) von der Nickelagarose abgelöst. Das Eluat wurde in

zehn Fraktionen von jeweils einem Milliliter in 1,5 ml-Tubes (Eppendorf) gesammelt; die einzelnen Fraktionen wurden dann mittels SDS-Gelelektrophorese (2.7) und anschließender Coomassie-Färbung (2.8) oder Western Blot (2.9) auf das Vorhandensein des spezifischen Proteins überprüft.

Fraktionen, die Protein enthielten, wurden ggf. gepoolt und in Dialysekassetten (Pierce) mit einem MWCO von >10kD gegen PBS (*phosphate buffered saline*; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) mit 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck) über Nacht dialysiert. Am folgenden Tag wurde dann noch ein Pufferwechsel durchgeführt. Diese Dialyse erfolgte vorwiegend zu dem Zweck, dass verbliebene Imidazolreste aus dem Dialysat entfernt werden konnten.

Anschließend überprüfte man die Proteinkonzentration mittels der Proteinbestimmung nach Lowry (2.10) und die Spezifität der Proteine im Western Blot mit einem Anti-E-Tag-Antikörper (2.9); die Proteinlösung wurde in 2 ml-Einfriertubes (Nunc) gefüllt und bis zum weiteren Gebrauch im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert.

## **2.7 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)**

Prinzip der Natrium-Dodecylsulfat (SDS, *sodium-dodecyl-sulfat*)–Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page) ist, die Proteine entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld aufzutrennen. Die Trennung findet in diesem Verfahren weitgehend unabhängig von der Nettoladung der jeweiligen Proteine statt, da das Natrium-Dodecylsulfat die Proteine mit einer negativen Ladung maskiert, so dass die eigene Ladung des Proteins kaum noch einen Einfluss auf die Trennung hat. Zudem werden die Proteine in diesem Verfahren denaturiert. Sie wandern im elektrischen Feld durch eine engmaschige Polyacrylamid-Gelmatrix; das hat den Effekt, dass kleine Proteine dieses Gel schneller durchwandern können als große Proteine. Nach der elektrophoretischen Auftrennung werden die Proteine entweder direkt auf dem Gel angefärbt (2.8) oder aber mittels Blotten (2.9) auf einer Membran immobilisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche Variante der Gelelektrophorese verwendet; das bedeutet, dass die Proteine zuerst ein Sammelgel passieren, in welchem sie zu einer scharfen Bande fokussiert werden; da-

nach wandern sie in das Trenngel ein. Es wurden 10%-ige Gele benutzt, die unter Verwendung folgender Reagenzien hergestellt wurden (Menge für jeweils 6 Gele):

<u>Trenngel (10 %)</u>		<u>Sammelgel</u>	
30 % Acrylamid	9,25 ml	30% Acrylamid	1,249 ml
2 M Tris pH 8,8	5 ml	1 M Tris pH 6,8	930 µl
10 % SDS	275 µl	10 % SDS	75 µl
Aqua dest	13 ml	Aqua dest	5,31 ml
10 % APS	103,3 µl	10 % APS	38 µl
TEMED	20,63 µl	TEMED	15 µl

Die Gele wurden in die Halterungen der Apparatur eingespannt und die Apparatur mit Laufpuffer (Tris/Glycin/SDS-Einfach-Puffer; 190 mM Glycin, 24 mM Tris, 0,1% SDS) aufgefüllt. Die Gele verfügen jeweils über 10 Taschen, in die dann die Proteine bzw. der Molekulargewichtsmarker eingebracht wurden. Man verwendete pro Tasche jeweils 16 µl der jeweiligen Proteinprobe, welche man mit 4 µl Fünffach-Laemmli-Puffer (10% SDS, 50% Glycerin, 0,4 M Tris, 10% 2-Mercaptoethanol, 0,1% Bromphenolblau) vermischte. Dieses Gemisch wurde für 3-5 min bei 95°C erhitzt, um die Proteine nahezu vollständig zu denaturieren. Zudem wurde ein Molekulargewichtsmarker (*Precision Plus Protein Dual Color Standard*, Bio-Rad, 10-250 kDa, Nr. 161-0374) verwendet. Anhand der definierten Banden, die dieser Marker liefert, konnte das Molekulargewicht der Proteine abgelesen werden. Von diesem Molekulargewichtsmarker wurden 4 µl aufgetragen.

Nach dem Auftragen der Proteinlösungen und des Markers konnten die Gele (10×6 cm) in die Gelelektrophoresekammer eingebracht werden; zur Auftrennung der Proteine stellte man 15 mA pro Gel (0,25 mA/cm<sup>2</sup>) ein und ließ die Gele für ca. 60 min in der Elektrophoresekammer, bis das Bromphenolblau das Gelende erreicht hatte. Daraufhin färbte man sie entweder direkt an oder überführte sie zum Blotting auf eine Nitrozellulosemembran in eine Semi-Dry-Blotkammer.

## 2.8 Gelfärbung

### Coomassie-Färbung

Um die Proteinbanden auf den Polyacrylamidgelen sichtbar zu machen, wurden die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt. Dazu wurde nach Beendigung der Elektrophorese das Gel für 30 min in die Coomassieblau-Färbelösung gelegt. Anschließend entfärbte man das Gel für 30-60 min in einer Entfärber-Lösung, bis die angefärbten Proteinbanden sichtbar waren. Folgende Reagenzien wurden hierfür verwendet:

Coomassieblau-Färbelösung: 1,25 g Coomassie Brilliant Blau  
500 ml Methanol  
100 ml Eisessig  
400 ml aqua dest

Entfärberlösung: 500 ml Methanol  
100 ml Eisessig  
400 ml aqua dest

## 2.9 Western Blot

Der Western Blot dient dazu, die Proteine, die in der SDS-Gelelektrophorese ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt werden, auf eine Membran (in diesem Falle wurden Nitrocellulosemembranen verwendet) zu transferieren (*blotting*) und mittels eines Antikörpers sichtbar zu machen. Durch die in der Blottingkammer angelegte Spannung wandern die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode, also zur Nitrocellulosemembran, auf welcher sie immobilisiert werden. Die Detektion des Proteins erfolgt durch einen primären Antikörper, der an spezifische Epitope des auf der Membran fixierten Zielproteins bindet, sowie durch einen Sekundärantikörper, bei dem es sich um ein enzymmarkiertes anti-Immunglobulin handelt. Dieses bindet den primären Antikörper an

dessen Fc-Teil. Daraufhin kann mittels Substratzugabe (ECL-Reagenz) das Protein auf der Nitrozellulosemembran sichtbar gemacht werden.

Der Western Blot erfolgte nach dem Sandwich-Prinzip: Zunächst wurden acht Filterpapiere (Whatmanpapier) mit Western Blot-Transferpuffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20% Methanol) angefeuchtet; daraufhin stapelte man vier dieser Filterpapiere auf die Anodenseite der Blotkammer, legte dann die Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell, Einbeck) darauf, platzierte vorsichtig das Gel (Kathodenseite) auf die Nitrozellulosemembran und bedeckte dieses schließlich mit den verbleibenden vier Filterpapieren. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass die Schichten fest übereinander lagen und sich keine Luftblasen bildeten. Man spannte dieses daraufhin in die Blotkammer ein und ließ es für 120 min bei 140 mA blotten. Nachdem der Blot beendet war, wurde die Nitrozellulosemembran zunächst für ein bis zwei Stunden bei RT in Blockierungspuffer inkubiert, welcher sich folgendermaßen zusammensetzt: PBS + 0,05% Tween 20 (Bio-Rad) (entspricht PBST) + 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck) + 5% fettfreies Milchpulver (Töpfer). Das Milchpulver hat die Funktion, unspezifische Bindungsstellen an der Membran, mit denen der Antikörper reagieren könnte, abzusättigen. Danach wurde der primäre Antikörper auf die Membran gegeben. Hierzu verwendete man einen anti-E-Tag-Antikörper (Amersham, Freiburg), der spezifisch an die E-Tag-Sequenz der rekombinanten Proteine bindet. Dieser Antikörper wurde im Verhältnis von 1:2000 in Blockierungspuffer verdünnt. Man ließ die mit dem primären Antikörper beschichtete Membran über Nacht bei 4 °C auf dem Taumler inkubieren. Am nächsten Morgen erfolgten dann drei Waschschritte für jeweils zehn Minuten mit Waschpuffer (PBST + 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck)), um den nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper beschichtet; hierzu wurde ein anti-Maus-IgG (Dako, Hamburg) verwendet, das mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) konjugiert war; man verdünnte diesen Antikörper in einer Konzentration von 1:2000 in Blockierungspuffer und ließ die mit dem Antikörper beschichtete Membran ungefähr eine Stunde bei RT unter Schwenkung inkubieren. Nach drei erneuten Waschvorgängen beschichtete man die Membran mit ECL (*enhanced chemoluminescence*)-

Reagenz (Amersham) für eine Minute und ließ dieses danach vorsichtig abfließen. Im nächsten Schritt wurde der Blot im Geldokumentationssystem entwickelt.

In dieser Arbeit wurde eine ausgewählte Gruppe von Patienten mittels Western Blot untersucht. Anhand von diesem immunologischen Nachweisverfahren kann die Reaktivität von Patientenseren gegen bestimmte Proteine anhand von Banden visuell dargestellt werden. Hierbei wurde der Versuch wie oben beschrieben durchgeführt; es wurde lediglich anstelle des primären anti-E-tag-Antikörpers das jeweilige Patientenserum verwendet, welches in einer Konzentration von 1:200 in Blockierungspuffer verdünnt wurde. Als sekundären Antikörper verwendete man anstelle des anti-Maus-IgG ein anti-human-IgG (Dako) bzw. anti-human-IgA (Dako), welche in einer Konzentration von 1:5000 (anti-human-IgG) bzw. 1:1000 (anti-human-IgA) in Blockierungspuffer eingesetzt wurden. Ansonsten erfolgte der Versuchsablauf wie oben beschrieben.

## **2.10 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Nach der Dialyse des Proteins wurde die Konzentration mittels des DC Protein Assay (Bio-Rad) bestimmt. Das Prinzip dieser modifizierten Form der quantitativen Proteinbestimmung nach Lowry beruht auf einem Farbumschlag, der abhängig von der jeweiligen Proteinkonzentration stattfindet und durch eine photometrische Messung bestimmt wird. Man stellt hierfür eine Verdünnungsreihe aus Rinder-Serumalbumin (BSA) her, welches in bestimmten Verhältnissen mit dem Dialysepuffer Einfach-PBS gemischt wird; diese Verdünnungsreihe dient als Kalibrierungsreihe. Die Konzentrationen, die diese Verdünnungsreihe aufweist, sind 1360 µg/ml, 680 µg/ml, 340 µg/ml, 170 µg/ml, 85 µg/ml, 42,5 µg/ml, 21,25 µg/ml und der Leerwert (enthält nur PBS). Die einzelnen Mischungen der Verdünnungsreihe sowie die zu bestimmenden Proben der Proteinlösung wurden in die Vertiefungen einer flachbodigen Mikrotiterplatte (Corning, Acton, USA) pipettiert; es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Pro Vertiefung wurden 20 µl der jeweiligen Probe aufgetragen. Zu jedem Ansatz wurden dann noch 10 µl Reagenz A und 80 µl Reagenz B hinzugegeben. Nach einer Inkuba-

tionszeit von 15 bis 45 min wurde die photometrische Messung bei 655 nm durchgeführt.

## **2.11 Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)**

Der ELISA (*Enzyme-linked-immunosorbent-assay*) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, durch welches beispielsweise Antikörper im Patientenserum gegen ein bestimmtes Antigen quantitativ nachgewiesen werden können. Die im Serum vorhandenen Antikörper binden an Proteine, die auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert sind; hierbei stellen die Antikörper im Serum den Primärantikörper dar. Als sekundärer Antikörper wird ein enzymgekoppelter Antikörper verwendet, der an den konstanten (Fc) Teil des Primärantikörpers bindet und nach Substratzugabe eine Farbreaktion hervorruft. Die Stärke der Farbreaktion, die photometrisch bestimmt wird, richtet sich nach der Konzentration des gebundenen Primärantikörpers aus dem Serum.

Ziel dieser Arbeit war es, einen ELISA zur Detektion von Autoantikörpern gegen Dsc in Seren von Patienten mit einer Pemphigus-Erkrankung zu etablieren. Die hierfür notwendigen rekombinanten Dsc wurden wie in 2.5 und 2.6 beschrieben im Baculovirus-Expressionssystem produziert. Mittels der Proteinbestimmung nach Lowry ermittelte man die jeweilige Proteinkonzentration und passte daraufhin die Verdünnung der Proteine in PBS für den ELISA an. Die Versuchsdurchführung erstreckte sich über drei Tage; im Laufe der Arbeit wurde das Verfahren für bestimmte Testungen auf einen Ablauf von vier Tagen modifiziert. Am ersten Tag wurden die Proteine in PBS + 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck) verdünnt und auf eine Mikrotiterplatte (*96-well polystyrene plates*, Corning) aufgetragen. Man setzte die Proteine so ein, dass sich eine Proteinkonzentration von ca. 0,5 µg pro Kavität ergab. Es wurden jeweils 50 µl Proteinlösung pro Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platten inkubierten daraufhin über Nacht bei 4°C im Kühlschrank; dadurch wurden die Proteine auf der Mikrotiterplatte immobilisiert.

Am zweiten Tag wurden die ELISA-Platten zunächst sechs mal mit Waschpuffer (PBS + 0,05% Tween 20 (Bio-Rad) + 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck)) gewaschen und nach jedem Waschvorgang ausgeklopft. Dieses diente der Elimination von

ungebundenem Protein. Daraufhin beschichtete man jede Vertiefung mit 100  $\mu$ l Blockierungspuffer (PBS + 0,05% Tween 20 (Bio-Rad) + 0,5 mM  $\text{CaCl}_2$  (Merck) + 5% fettfreies Milchpulver), um unspezifische Bindungsstellen, mit denen der Antikörper unspezifisch reagieren könnte, abzusättigen. Die mit Blockierungspuffer beschichteten Mikrotiterplatten ließ man ca. eine Stunde bei RT inkubieren. Danach wurde der Blockierungspuffer abgegossen und die in Blockierungspuffer verdünnten Patientenseren auf die Platten gegeben (je 50  $\mu$ l pro Vertiefung). Man verdünnte die Patientenseren in einer Konzentration von 1:50. Die Platten wurden über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Am dritten Tag wurden die Mikrotiterplatten erneut sechs mal mit Waschpuffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Als sekundärer Antikörper wurde ein enzymgekoppelter Zweitantikörper (HRP-konjugiertes anti-human-IgG (Dako) bzw. HRP-konjugiertes anti-human-IgA (Dako)) verwendet, der in Blockierungspuffer in einer Konzentration von 1:5000 (anti-human-IgG) bzw. 1:1000 (anti-human-IgA) verdünnt wurde; pro Vertiefung wurden 50  $\mu$ l pipettiert. Es erfolgte eine Inkubation von einer Stunde bei RT. Daraufhin wurden die Platten erneut sechs mal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit der Substratlösung (50  $\mu$ l pro Kavität) beschichtet. Hierfür verwendete man 100 mg ABTS (Calbiochem, Bad Schwalbach) in 100 ml Phosphat-Citrat-Puffer (51,5 ml 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 48,5 ml 0,1 M Zitronensäure (Merck)). Vor Gebrauch wurde noch 1  $\mu$ l Wasserstoffperoxid (30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Merck) pro 5 ml Substratlösung zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von ungefähr zehn Minuten begann man, den entstandenen Farbumschlag photometrisch im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm als Extinktion zu messen; die Messungen jeder Platte erfolgten in Abständen von ungefähr 5 min und man führte diese Messungen für ca. 40 min fort. Dabei sollte die OD der Negativkontrolle den Cut-off-Wert von 0,376 nicht überschreiten.

Da während der Versuche auffiel, dass eine Negativkontrolle sowie mehrere PV-Patienten unspezifisch auf in der Proteinlösung enthaltene mitexprimierte Proteine reagierten, wurde der ELISA für diese Fälle auf folgende Weise modifiziert: Die jeweiligen Patientenseren wurden zunächst mit anderen Proteinen, die ebenfalls im Baculovirus-Expressionssystem synthetisiert worden waren und folglich die gleichen unspezifischen Proteine wie die Lösung der rekombi-

nanten Dsc enthalten mussten, präinkubiert. Hierzu beschichtete man eine Mikrotiterplatte (*96-well polystyrene plates*, Corning) mit Pemphaxin oder alternativ mit Dsg1, welche in PBS + CaCl<sub>2</sub> so verdünnt wurden, dass sich eine Proteinkonzentration von 0,5 µg pro Vertiefung ergab (50 µl pro Kavität). Diese Mikrotiterplatte ließ man über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubieren. Am folgenden Tag wurde die Platte wie oben beschrieben sechs Waschschrritten unterzogen, für eine Stunde mit Blockierungspuffer bei RT inkubiert und daraufhin wurden die jeweiligen Patientenseren in einer Verdünnung von 1:50 auf die Platte gegeben (55 µl pro Kavität). Die Platten inkubierten über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurden die Patientenseren aus den Kavitäten der Mikrotiterplatten abgenommen und konnten auf die wie oben beschrieben vorbereiteten ELISA-Platten, die mit den Dsc-Konstrukten beschichtet waren, gegeben werden. Der Versuchsablauf verlängerte sich dadurch um einen Tag auf vier Tage. Anhand dieser Methode gelang es, Reaktivitäten gegen unspezifisches Protein von spezifischer Reaktivität gegen die Dsc-Konstrukte zu unterscheiden.

## **2.12 Patienten und Kontrollen**

In dieser Arbeit wurden insgesamt 124 Patienten auf das Vorliegen von Autoantikörpern gegen Dsc untersucht. Diese Patienten teilten sich auf in eine Gruppe von 82 PV-Patienten mit unterschiedlicher klinischer Aktivität und verschiedenen klinischen Phänotypen, fünf Patienten mit IgA-Pemphigus, drei Patienten mit PNP, zwei Patienten mit atypischen (i.e. klinisch polymorphen) Pemphigus-Erkrankungen sowie 32 Patienten mit bisher noch nicht genau klassifizierten Hauterkrankungen, bei denen der Verdacht auf eine Pemphigus-Erkrankung bestand. Zudem wurden 22 gesunde Kontrollpersonen untersucht. Die Patientenseren sowie die Seren der Kontrollpersonen wurden vor der Analyse bei -20°C aufbewahrt.

Bei den Patienten mit PV-Erkrankung handelte es sich um Patienten, welche in den Dermatologischen Kliniken der Universitäten Marburg, Erlangen und Aachen behandelt worden waren. Die klinische Diagnose des PV wurde wie folgt bestätigt:

1. Typische klinische Präsentation mit fragilen Blasen und Erosionen an Schleimhäuten und an der Haut

2. Histopathologisch nachweisbare suprabasale Akantholyse
3. in der direkten Immunfluoreszenz nachweisbare IgG-Ablagerungen auf der Oberfläche epidermaler Keratinozyten in periläsionaler Haut
4. in der indirekten Immunfluoreszenz nachweisbare interzelluläre IgG-Reaktivität zirkulierender Autoantikörper mit Epithelzellen des Affenösophagus
5. Detektion von anti-Dsg3 + /- anti-Dsg1 IgG-Autoantikörpern im ELISA

Die Krankheitsaktivität der PV-Patienten wurde bezüglich der Erkrankungsdauer sowie des Ausmaßes und der Anzahl an Blasen wie folgt eingeteilt:

1. akute Erkrankung (Dauer < 3 Monate, Beteiligung von mehr als 20% der Körperoberfläche mit weit gestreuten, unzählbaren Blasen)
2. chronische Erkrankung (Dauer > 3 Monate, wenige Blasen, die höchstens 20% der Körperoberfläche betreffen)
3. Remission (keine klinischen Symptome seit mehr als einem Monat)

Zudem wurde der klinische Phänotyp nach dem bevorzugten Erscheinungsort der Blasen in mukosal (reine Schleimhautbeteiligung), mukokutan (sowohl Haut- als auch Schleimhautbeteiligung) bzw. kutan (reine Hautbeteiligung) eingeteilt.

Die Gruppe der PV-Patienten teilte sich wie folgt auf:

27 im Akutstadium:	4 mit alleinigem Mukosabefall
	21 mit Befall von Haut und Schleimhaut
	2 mit alleinigem Hautbefall
41 im chronischen Stadium:	10 mit alleinigem Mukosabefall
	27 mit Befall von Haut und Schleimhaut
	4 mit alleinigem Hautbefall
14 in Remission:	3 mit alleinigem Mukosabefall
	10 mit Befall von Haut und Schleimhaut
	1 mit alleinigem Hautbefall

Fünf Seren von Patienten mit IgA-Pemphigus wurden untersucht; diese zeichneten sich klinisch durch Pusteln aus, welche die Tendenz besaßen, kreisförmig zu konfluieren. Von einem dieser Patienten war bekannt, dass es sich um einen SPD-Typ des IgA-Pemphigus handelte; dieses Serum war ein freundliches Geschenk von Prof. Hashimoto, Kurume Universität. Ein weiteres Serum eines Patienten mit IgA-Pemphigus war ein freundliches Geschenk von Prof. Müllegger, Landesklinikum Wiener Neustadt. Zwei weitere Seren von Patienten mit IgA-Pemphigus wurden freundlicherweise von PD Dr. Messer, Ludwig-Maximilians-Universität München, zur Verfügung gestellt.

Die drei Patienten, die an PNP erkrankt waren, hatten einen starken, chronisch progressiven Befall der Mundschleimhaut; ihre Erkrankung war mit hämatologischen Erkrankungen assoziiert und sie zeigten IgG-Reaktivität gegen Dsg3 sowie gegen andere Komponenten des desmosomalen Plaques. Die Seren dieser Patienten waren ein freundliches Geschenk von PD Dr. Messer, LMU München. Zwei Patienten trugen die Diagnose atypischer Pemphigus, i.e. klinisch polymorpher Pemphigus. Eines dieser Patientenserum wurde freundlicherweise von Prof. Hashimoto, Kurume Universität, zur Verfügung gestellt; dieser Patient war in der Literatur schon von Chorzelski et al. beschrieben worden und zeigte atypische klinische und histopathologische Veränderungen, die mit IgG- und IgA-Reaktivität gegen bovine Dsc assoziiert waren (Chorzelski et al., 1994). Der zweite Patient mit atypischem Pemphigus wurde in der dermatologischen Universitätsklinik Marburg behandelt; er zeigte urtikarielle Plaques am Rumpf, einhergehend mit dem Bild einer eosinophilen Zellulitis, ohne Schleimhautbeteiligung; im Verlauf entwickelte er pralle Blasen. Histologisch zeigte sich eine eosinophile Spongiose sowie eine intraepidermale akantholytische Spaltbildung und in der direkten Immunfluoreszenz waren interzelluläre epidermale Ablagerungen von Komplementfaktoren (C3) detektierbar.

Bei den 32 noch nicht genau klassifizierten Patientenserum handelte es sich um Patienten, die in der Universitätsklinik für Dermatologie, Marburg, behandelt wurden oder deren Seren zur Diagnostik eingesendet wurden. Bei diesen Patienten bestand der Verdacht auf eine Pemphigus-Erkrankung.

Als Negativkontrollen dienten 22 gesunde Kontrollpersonen.

Die Patienten sowie die gesunden Kontrollpersonen gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie, die den Richtlinien der Deklaration von Helsinki entsprach.

### 2.13 Geräte

Bakterieninkubator Orbital Shaker	Forma Scientific, Waltham, USA
Biofuge 15	Heraeus, Hanau
Blotkammer	Biometra, Göttingen
ELISA Reader Multiscan Ex	Thermo Electron Corporation, Dreieich
Feinwaage	Kern, Balingen
Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Düsseldorf
Geldokumentationssystem (Chemi Smart 2000)	PeqLab, Erlangen
Gelelektrophoresekammer (Mini-Protean3 Dodeca™ Cell)	Bio-Rad, München
Lichtmikroskop ID03	Zeiss, Oberkochen
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe für Einmalpipetten	Becton Dickinson, Heidelberg
Rotator für Rollerflaschen	Ratek, Boronia, Australien
Sterilwerkbank LaminAir	Heraeus, Hanau

Taumler

Heidolph Instruments, Schwabach

Vortex Genius 3

IKA, Staufen

Wärmeschrank

Heraeus, Hanau

Wasserbad

GFL, Burgwedel

### **3 Ergebnisse**

In dieser Arbeit wurden zunächst die rekombinanten Proteine Dsc1, 2 und 3, deren Baculovirustransfervektoren freundlicherweise von Prof. Hashimoto, Kurume Universität, zur Verfügung gestellt worden waren, im Baculovirus-Expressionssystem hergestellt. Mit diesen Proteinen wurde dann ein ELISA zur Detektion von Autoantikörpern vom Typ IgG und IgA in Patientenseren etabliert. Daraufhin wurden 82 Seren von Patienten, die an PV erkrankt waren, fünf Seren von Patienten mit IgA-Pemphigus, drei Seren von Patienten mit PNP, zwei Seren von Patienten mit atypischem Pemphigus und 32 Seren von Patienten mit noch nicht genau klassifizierten Erkrankungen, bei denen der Verdacht auf eine Pemphigus-Erkrankung bestand, auf Autoantikörper gegen die Dsc-Konstrukte untersucht. Zusätzlich wurden 22 gesunde Kontrollpersonen getestet. Anschließend wurden noch ausgewählte Patienten mittels Western Blot auf Autoantikörper gegen Dsc untersucht.

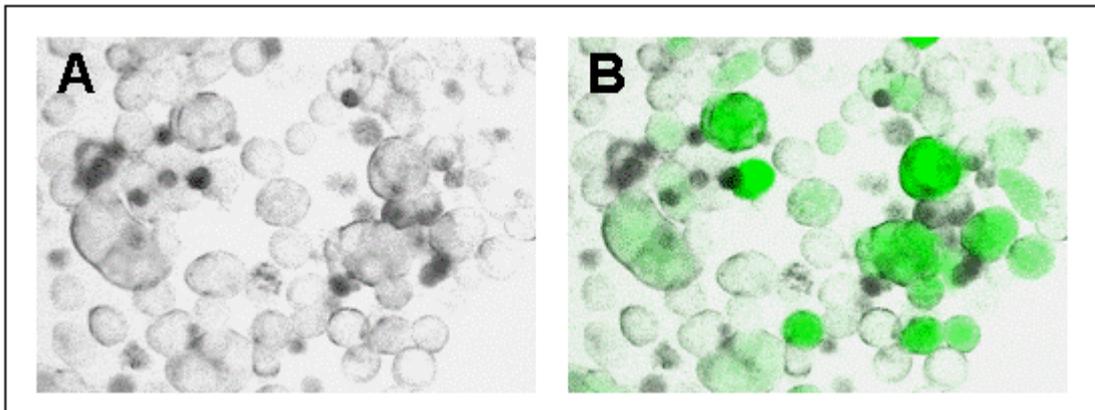
#### **3.1 Herstellung der rekombinanten Dsc-Proteine**

Die rekombinanten Dsc wurden im Baculovirus-Expressionssystem wie in 2.5 und 2.6 beschrieben exprimiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt.

##### **3.1.1 Nachweis der erfolgten Transfektion und Virusamplifikation durch Licht- und Fluoreszenzmikroskopie**

Für die Amplifikation des Baculovirus wurden Insektenzellen der Art *Spodoptera frugiperda* (SF-21, Invitrogen) verwendet; die Infektion der Zellen mit Baculovirus konnte auf zwei Arten nachgewiesen werden: Lichtmikroskopisch zeigte sich bereits nach zwei bis drei Tagen ein zytopathologischer Effekt; die Insektenzellen waren stark aufgetrieben und wiesen vergrößerte Kerne auf (Abb. 3.1a). Auch konnte man einen starken Adhäsionsverlust beobachten. Fluoreszenzmikroskopisch konnte man sehen, dass die Zellen grün leuchteten (Abb. 3.1b). Dieses geschieht aufgrund der Tatsache, dass durch die Infektion mit dem *Baculo Gold Bright Virus* ein grün fluoreszierendes Protein (GFP, *green*

*fluorescent protein*) koexprimiert wird, welches die infizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop grün leuchten lässt.

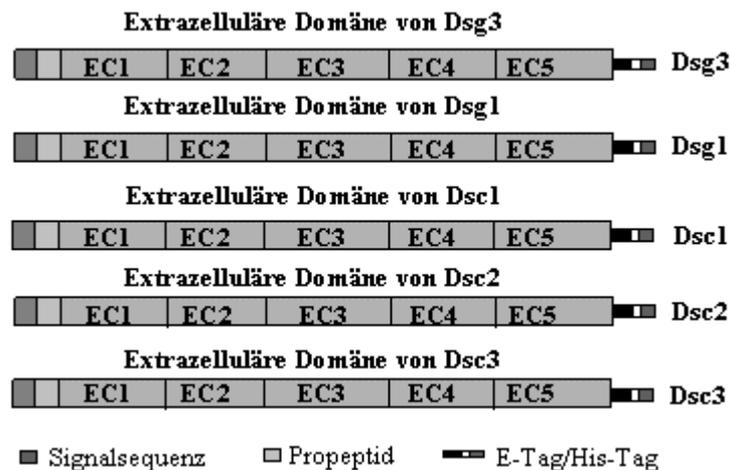


**Abb. 3.1: Darstellung virusinfizierter SF-21-Zellen mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie**

Bei den in A dargestellten Zellen handelt es sich um virusinfizierte SF-21-Zellen, die lichtmikroskopisch dargestellt sind; sie erscheinen stark aufgetrieben. In B sind die Zellen aus der gleichen Kulturflasche fluoreszenzmikroskopisch gezeigt. Die infizierten Zellen leuchten hier grün. Sie wurden mit dem Dsc1-Baculovirus infiziert und befinden sich am Tag 2 der Infektion.

### **3.1.2 Nachweis der rekombinanten Proteine mittels Western Blot**

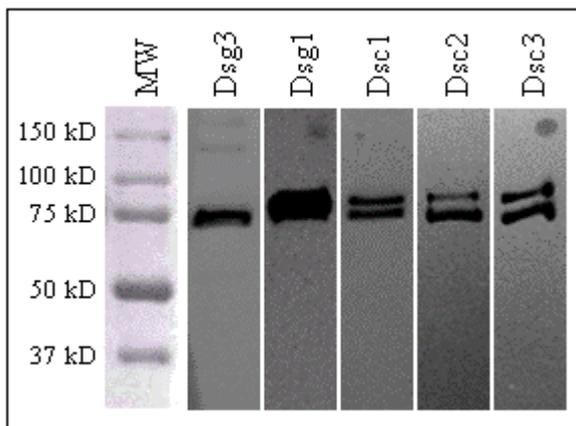
Die im Baculovirus-Expressionssystem exprimierten und affinitätschromatographisch aufgereinigten rekombinanten Dsc repräsentieren die extrazelluläre Domäne der Dsc, die aus jeweils fünf ähnlichen, extrazellulären Domänen besteht und eine Signalsequenz, ein Propeptid, einen E-Tag und einen His-Tag enthält. In Abb. 3.2a sind die rekombinanten Dsc sowie Dsg3 und Dsg1 schematisch dargestellt.



**Abb. 3.2a: Rekombinante Proteine, die die extrazelluläre Domäne von Dsg3, Dsg1 und Dsc1-3 darstellen**

Schematisch dargestellt sind die rekombinanten Proteine Dsg3, Dsg1 und Dsc1-3, die den jeweiligen extrazellulären Anteil der Proteine repräsentieren. Sie verfügen jeweils über fünf einzelne, extrazelluläre Domänen (EC1-5), eine Signalsequenz und ein Propeptid, die sich N-terminal befinden, sowie einen E-Tag und einen His-Tag am COOH-Terminus.

Im Anschluss an die Proteinproduktion wurden die rekombinanten Proteine Dsc1-3 mittels Western Blot (2.9) nachgewiesen. Dazu wurden die im Baculovirus-Expressionssystem exprimierte rekombinante Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Semi Dry Blot auf einer Membran immobilisiert. Um die Banden der rekombinanten Proteine sichtbar zu machen, wurde als Primärantikörper ein gegen den E-Tag der Proteine gerichteter Antikörper (anti-E-Tag-Antikörper, Amersham) verwendet. Als Sekundärantikörper wurde ein Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*)-gekoppelter anti-Maus-IgG-Antikörper (Dako) eingesetzt. Durch Zugabe von ECL (*enhanced chemoluminescence*, Amersham) und der dadurch aktivierten Lichtreaktion konnten die Banden im Geldokumentationssystem dargestellt werden. In Abb. 3.2b sind die rekombinanten Dsc1-3 sowie Dsg3 und Dsg1 im Western Blot gezeigt.



**Abb. 3.2b: Nachweis der rekombinanten Proteine mittels Western Blot**

Die rekombinanten Proteine Dsg3, Dsg1 und Dsc1-3 werden im Western Blot mittels anti-E-Tag-Antikörper dargestellt. Die Banden zeigen sich bei den erwarteten Molekulargewichten (MW in kD). Die höheren Banden, die bei den rekombinanten Dsc sichtbar sind, repräsentieren die unprozessierten Proteine.

(nach Müller et al., 2009)

### 3.1.3 Etablierung des ELISA

Die im Baculovirus-Expressionssystem exprimierten, rekombinanten Proteine wurden im ELISA zur Detektion von Autoantikörpern in Seren von Pemphigus-Patienten eingesetzt. Hierzu orientierte man sich an dem in der Arbeitsgruppe bereits etablierten ELISA zur Detektion von Autoantikörpern gegen Dsg3. Die rekombinanten Dsc wurden so in PBS + CaCl<sub>2</sub> (Merck) verdünnt, dass sich eine Proteinkonzentration von ca. 0,5 µg pro Vertiefung ergab. Die Seren der zu testenden Patienten und gesunden Kontrollpersonen wurden analog zu dem bereits etablierten ELISA in einer Verdünnung von 1:50 in PBST + CaCl<sub>2</sub> (Merck) + 5% fettfreies Milchpulver eingesetzt. Zusätzlich zu den Dsc wurden alle zu testenden Seren auf Reaktivität gegen die gesamte extrazelluläre Domäne von Dsg3 (Dsg3EC1-5) untersucht; einige ausgewählte Seren wurden zudem auf Reaktivität gegen Dsg1 getestet. Diese Proteine wurden in der Arbeitsgruppe ebenfalls im Baculovirus-Expressionssystem exprimiert und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Als Referenzwert wurde auf allen ELISA-Platten die in der Arbeitsgruppe benutzte Positivkontrolle für Dsg3 mit aufgetragen; hierbei handelte es sich um einen PV-Patienten, bei dem bekannterweise IgG-Autoantikörper gegen Dsg3 nachweisbar waren. Zudem ließ man pro Platte mindestens eine Negativkontrolle einer gesunden Kontrollperson mitlaufen. Wenn die Positivkontrolle einen OD (*optical density*)-Wert von 0,8 erreicht hatte, und dabei die Negativkontrolle unter dem Cut-off-OD-Wert von 0,376 lag, wurde die Messung der gesamten

Mikrotiterplatte verwendet. Dieses machte die Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten vergleichbar. Die Untersuchungen wurden in Zweifachansätzen durchgeführt, so dass bei jedem Patienten bzw. bei jeder Kontrolle der Mittelwert der Doppelbestimmungen gebildet wurde. Die Messung wurde wiederholt, wenn bei Patienten die Doppelwerte zu weit auseinander lagen oder wenn Positiv- oder Negativkontrolle zu niedrig bzw. zu hoch reagiert hatten. Bei einigen Patienten wurde die Messung zu einem anderen Zeitpunkt auf einer anderen Mikrotiterplatte wiederholt. Die Ergebnisse von unterschiedlichen Messungen an verschiedenen Tagen waren sehr ähnlich; hierdurch wurde bestätigt, dass sie reproduzierbar waren.

Für den bereits in der Arbeitsgruppe etablierten ELISA der gesamten extrazellulären Domäne von Dsg3 (Dsg3EC1-5) hatten Müller et al. anhand einer ROC (*receiver operating characteristic*)-Kurve bereits einen *Cut-off-Wert* ermittelt, welcher angibt, ab wann die Reaktivität einer Serumprobe als positiv gewertet wird. Die ROC-Kurve konnte anhand eines großen Patientenkollektivs mit Hilfe von SPSS (SPSS Inc., Chicago IL, USA) erstellt werden (Müller et al., 2006). Der ermittelte *Cut-off-Wert* lag bei einer OD von 0,376. Da es sich bei den rekombinanten Dsc um das gleiche Expressionssystem handelt, wurde der Schwellenwert, der für Dsg3 ermittelt worden war, ebenfalls für die Dsc verwendet. Demzufolge wurden OD-Werte, die größer als 0,376 waren, als positiv, und OD-Werte, die unter dem *Cut-Off-Wert* von 0,376 lagen, als negativ gewertet. Für die Ermittlung einer eigenen ROC-Kurve für die rekombinanten Dsc standen bisher noch nicht genügend Positivkontrollen zur Verfügung; in Zukunft sollte diese allerdings erstellt werden, um das System zu optimieren. Außerdem sollte die Berechnung eines PIV (*protein index value*) für den Dsc-ELISA etabliert werden.

### **3.1.3.1 Detektion von Antikörpern des Typs IgG und IgA**

Bei dem in der Arbeitsgruppe etablierten Dsg3-ELISA handelt es sich um einen Assay zur Detektion von Autoantikörpern vom Typ IgG. Hierzu wird als sekundärer Antikörper ein HRP-konjugierter anti-human-IgG-Antikörper (Dako) verwendet; dieser wird in einer Verdünnung von 1:5000 in PBST + CaCl<sub>2</sub> (Merck) +

5% Milchpulver eingesetzt. Für die Detektion von IgG-Autoantikörpern gegen die rekombinanten Dsc wurde der anti-human-IgG-Antikörper analog zu dem bereits etablierten ELISA der Arbeitsgruppe ebenfalls in einer Konzentration von 1:5000 verwendet.

Für die hier vorliegende Arbeit sollten zusätzlich ausgewählte Patientenseren auf IgA-Reaktivität gegen die rekombinanten Dsc untersucht werden. Hierfür wurde ein HRP-konjugierter anti-human-IgA-Antikörper (Dako) angeschafft; die Verdünnung, in der dieser eingesetzt werden konnte, musste zunächst noch experimentell ermittelt werden. Hierzu verwendete man das Serum eines Patienten, der am bullösen Pemphigoid (BP) erkrankt war und von dem bekannt war, dass er Autoantikörper vom Typ IgA gegen das Antigen BP230 gebildet hatte. Man führte mit diesem Patientenserum ELISA-Analysen zum Nachweis von Autoantikörpern gegen BP230 unter Einsatz des neu erworbenen anti-human-IgA-Antikörpers durch, welcher in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt wurde. In diesen Versuchen zeigte sich eine maximale Reaktivität des Patientenserums gegen BP230 bei einer Konzentration des sekundären anti-human-IgA-Antikörpers von 1:1000 in PBST + CaCl<sub>2</sub> (Merck) + 5% Milchpulver, so dass dieser sekundäre Antikörper in weiteren Versuchen in dieser Verdünnung verwendet wurde.

### **3.1.3.2 Versuchsmodifizierung**

Während des oben beschriebenen, dreitägigen Versuchsablaufes fiel auf, dass manche PV-Patienten sowie eine Negativkontrolle gegen alle Dsc-Konstrukte starke Reaktivität zeigten, die deutlich über dem *Cut-off*-Wert von 0,376 lag. Die Validität dieser Ergebnisse erschien unwahrscheinlich, da in einer neueren Studie, in der die Reaktivität von Pemphigus-Patienten gegen rekombinante Dsc untersucht worden war, keiner der 45 untersuchten klassischen Pemphigus-Patienten Reaktivität gegen Dsc zeigte; zudem reagierten die Patienten dieser Studie, bei denen Autoantikörper gegen Dsc detektiert wurden (IgA-Pemphigus-, PNP- und atypische Pemphigus-Patienten) jeweils gegen maximal zwei der drei Dsc-Konstrukte. Außerdem war keine der 23 Kontrollpersonen Dsc-positiv (Hisamatsu et al., 2004).

Aufgrund dessen war anzunehmen, dass es sich bei den hohen detektierten Reaktivitäten um unspezifische Reaktionen gegen Proteine handelte, die bei der Produktion und der Aufreinigung der Proteine ebenso mit Nickel reagiert hatten und somit im aufgereinigten spezifischen Protein enthalten waren. Um dies sicher zu stellen, wurden Versuche unternommen, in denen die Seren der entsprechenden Patienten zunächst mit anderen rekombinanten Proteinen, die ebenfalls im Baculovirus-Expressionssystem hergestellt worden waren, präinkubiert wurden. Da die zur Präinkubation verwendeten Proteine ebenfalls im Baculovirus-Expressionssystem produziert worden waren, konnte man davon ausgehen, dass sie ähnliche unspezifische Proteine wie die Lösung der rekombinanten Dsc enthielten. Für die Präinkubation wurden rekombinantes Dsg1 und Pemphaxin, welche freundlicherweise von der Arbeitsgruppe bereit gestellt wurden, verwendet. Das Pemphaxin wurde im weiteren Verlauf der Arbeit auch für den Zweck der Präinkubation wie in 2.5 und 2.6 beschrieben produziert. Pemphaxin bzw. Dsg1 wurden in PBS + CaCl<sub>2</sub> (Merck) verdünnt und in einer Proteinkonzentration von 0,5 µg pro Vertiefung eingesetzt und der Versuchsablauf wurde wie in 2.11 beschrieben durchgeführt.

Bei der Auswertung der Ergebnisse dieser präinkubierten Patientenseren zeigte sich, dass die PV-Seren sowie das Serum der Kontrollperson keine Reaktivität mehr gegen Dsc aufwiesen. Daraus ließ sich schließen, dass es sich um unspezifische Reaktivitäten gehandelt haben musste, wie bereits vorher erwartet.

Anhand der Präinkubationsmethode gelang es, unspezifische Reaktivitäten gegen im Baculovirus-Expressionssystem koexprimierte, unspezifische Proteine von der spezifischen Reaktivität gegen Dsc zu unterscheiden.

#### **3.1.4 Nachweis der rekombinanten Desmocolline mittels ELISA**

Da die rekombinanten Proteine über einen E-Tag verfügen, kann man sie im ELISA mittels eines anti-E-Tag-Antikörpers (Amersham) detektieren. Dieser Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:2000 in PBST + 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck) + 5% fettfreies Milchpulver verdünnt und analog zur Versuchsbeschreibung (2.11) als primärer Antikörper eingesetzt. Als sekundärer Antikörper diente ein mit Meerrettichperoxidase konjugiertes anti-Maus-IgG (Dako), welches in

einer Verdünnung von 1:2000 in PBST + 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck) + 5 % Milchpulver eingesetzt wurde. Die rekombinanten Dsc waren mit Hilfe des anti-E-Tag-Antikörpers im ELISA nachweisbar (Tab. 3.1).

Zum spezifischen Nachweis des Dsc1 wurde von Prof. Hashimoto, Kurume Universität, freundlicherweise eine Positivkontrolle zur Verfügung gestellt; hierbei handelte es sich um ein Patientenserum, von dem bekannt war, dass es Autoantikörper vom Typ IgG und IgA gegen die extrazelluläre Domäne von Dsc1 enthielt. Als sekundärer Antikörper diente das bereits beschriebene anti-human-IgG (Dako) bzw. anti-human-IgA (Dako). Im ELISA konnte die spezifische Reaktivität der Serumprobe gegen Dsc1 nachgewiesen werden. In Tab. 3.1 ist die IgG-Reaktivität der Serumprobe gegen Dsc1 dargestellt.

Für den spezifischen Nachweis von Dsc3 wurde von Dr. A. Schmidt, Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg, freundlicherweise ein gegen die extrazelluläre Domäne von Dsc3 gerichteter Antikörper zur Verfügung gestellt. Dieser wurde in einer Konzentration von 1:500 im ELISA eingesetzt; als sekundärer Antikörper wurde das anti-Maus-IgG (Dako) in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet. In den Versuchen konnte eine spezifische Reaktivität des Antikörpers gegen Dsc3 gezeigt werden (Tab. 3.1).

**Tab. 3.1: Nachweis der rekombinanten Dsc im ELISA**

<b>Proteinkonstrukt</b>	<b>Dsc1</b>	<b>Dsc2</b>	<b>Dsc3</b>
OD (anti-E-Tag)	1,1565	1,194	1,242
OD (anti-Dsc1)	1,072	0,238	0,3095
OD (anti-Dsc3)	0,175	0,2115	1,0555

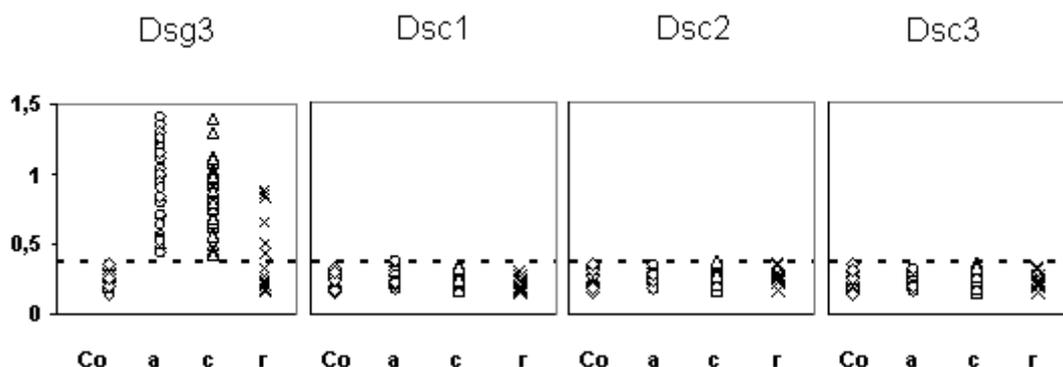
In der Tabelle ist der Nachweis der Dsc im ELISA mittels anti-E-Tag-Antikörper dargestellt; des weiteren wurde Dsc1 spezifisch mittels einer Positivkontrolle (Serumprobe) sowie Dsc3 spezifisch mittels eines anti-Dsc3-Antikörpers nachgewiesen.

### 3.2 Testung von Patienten und Negativkontrollen auf Autoantikörper gegen Dsc mittels ELISA

#### 3.2.1 Klassifizierte Patienten mit Pemphigus vulgaris

Die Gruppe der an PV Erkrankten bestand aus 82 Patienten, von denen sich 27 im akuten, 41 im chronischen Stadium und 14 in Remission befanden (2.12). Phänotypisch unterschieden sich die Patienten zwischen alleinigem Mukosabefall (n=17), alleinigem Hautbefall (n=7) und einer Kombination (n=58) aus beidem.

In Abb. 3.3a sind die im ELISA gemessenen IgG-Reaktivitäten der PV-Patienten in unterschiedlichen Krankheitsstadien (akut, chronisch, in Remission) sowie der 22 gesunden Kontrollpersonen dargestellt.



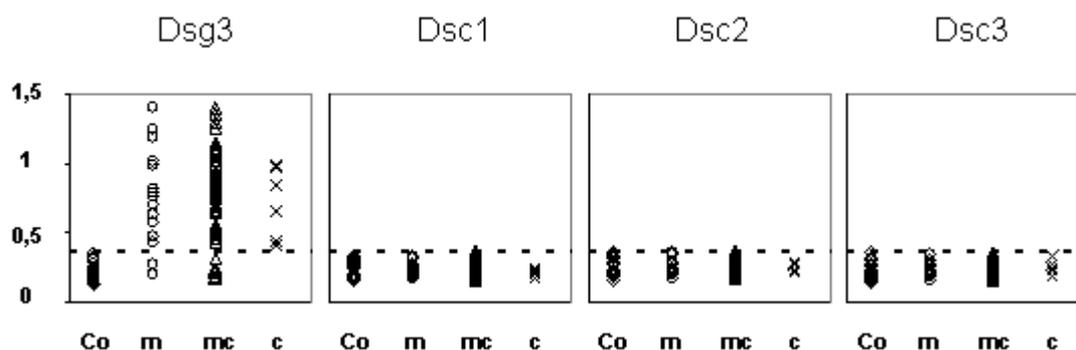
**Abb. 3.3a: IgG-Reaktivität gegen Dsg3 und Dsc1-3 bei Patienten mit PV in verschiedenen Krankheitsstadien (akut, chronisch, in Remission)**

Dargestellt sind Autoantikörper-Profile von Patienten mit PV in verschiedenen Krankheitsstadien, akut (a) (n=27), chronisch (c) (n=41) und in Remission (r) (n=14) gegen Dsg3 und Dsc1-3. Zusätzlich wurden 22 gesunde Kontrollpersonen (Co) untersucht. Die Testung der Seren erfolgte mittels ELISA; aufgetragen sind die ermittelten OD-Werte, welche die Autoantikörpertiter der Getesteten darstellen. Die gestrichelte Linie repräsentiert den *Cut-off*-Wert bei einer OD von 0,376.

Wie aus der dargestellten Graphik ersichtlich, zeigten PV-Patienten, je nach Krankheitsaktivität, unterschiedlich hohe IgG-Titer gegen die gesamte extrazelluläre Domäne von Dsg3. So waren für alle PV-Patienten im akuten und chroni-

schen Stadium deutlich erhöhte IgG-Titer gegen Dsg3 nachweisbar. Im Durchschnitt waren die Titer in der Gruppe der akut Erkrankten am höchsten; Patienten in Remission wiesen deutlich niedrigere Autoantikörpertiter auf. Alle PV-Patienten waren negativ gegen Dsc1-3; hier bestand auch kein Unterschied zwischen den verschiedenen Krankheitsstadien; weder bei akut oder chronisch Erkrankten noch bei Patienten in Remission war eine positive Reaktivität gegen Dsc1-3 nachweisbar. Alle 22 getesteten gesunden Kontrollpersonen waren negativ gegen Dsg3 und Dsc1-3.

In Abb. 3.3b sind die IgG-Autoantikörpertiter der oben beschriebenen PV-Patienten gegen Dsg3 und Dsc1-3 dargestellt; die Patienten sind hier nach klinischem Phänotyp in mukosale, mukokutane sowie kutane Manifestation aufgeteilt.



**Abb. 3.3b: IgG-Reaktivität gegen Dsg3 und Dsc1-3 bei Patienten mit PV mit unterschiedlichen klinischen Phänotypen (mukosal, mukokutan, kutan)**

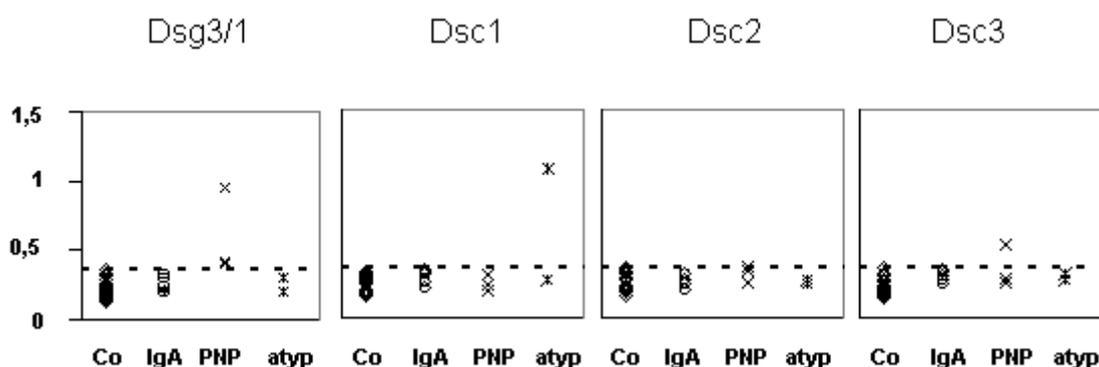
Die Abbildung zeigt die Autoantikörper-Profile der oben beschriebenen PV-Patienten eingeteilt nach unterschiedlicher klinischer Manifestation. Die Phänotypen teilen sich auf in alleinigen Mukosabefall (m; n=17), sowohl Schleimhaut- als auch Hautbefall (mukokutaner Befall) (mc; n=58) und alleinige kutane Manifestation (c; n=7). Zusätzlich wurden 22 gesunde Kontrollpersonen untersucht. Die OD-Werte sind links aufgetragen; die gestrichelte Linie stellt den *Cut-off*-Wert bei 0,376 dar.

Aus der Graphik wird ersichtlich, dass die PV-Patienten unterschiedlicher klinischer Phänotypen keine nachweisbare Reaktivität gegen Dsc aufwiesen.

### 3.2.2 Patienten mit IgA-Pemphigus, PNP und atypischem Pemphigus

Es wurden fünf Patienten, die an IgA-Pemphigus erkrankt waren, drei Patienten mit PNP und zwei Patienten mit atypischem, i.e. klinisch polymorphem, Pemphigus auf Autoantikörper vom Typ IgG und IgA mittels ELISA untersucht. Von einem der fünf Patienten mit IgA-Pemphigus war bekannt, dass es sich um den SPD-Typ des IgA-Pemphigus handelte (2.12).

Abb. 3.4a stellt die IgG-Autoantikörperprofile der Patienten sowie der 22 gesunden Kontrollpersonen dar.

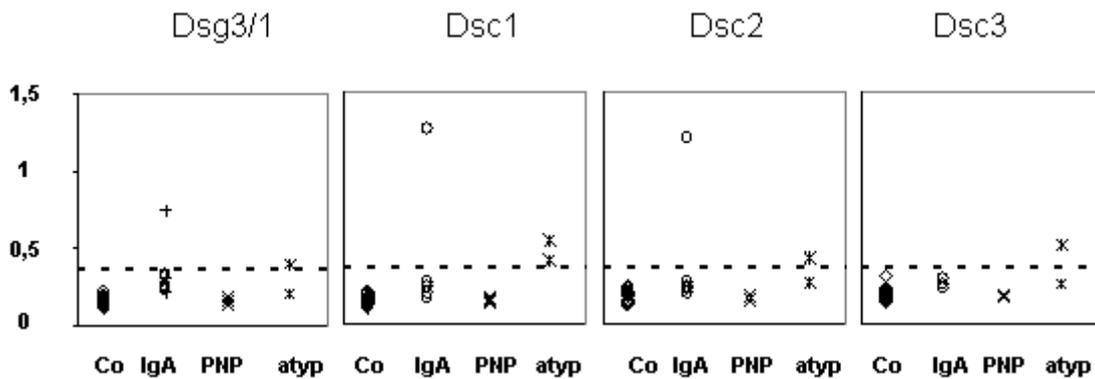


**Abb. 3.4a: IgG-Reaktivität gegen Dsg3/1 und Dsc1-3 bei Patienten mit IgA-Pemphigus, PNP und atypischem Pemphigus**

IgG-Autoantikörperprofile gegen Dsg3 und Dsc1-3 bei Patienten mit IgA-Pemphigus (IgA; n=5), paraneoplastischem Pemphigus (PNP; n=3) und atypischem Pemphigus (atyp; n=2). Drei der Patienten mit IgA-Pemphigus wurden zusätzlich auf IgG-Antikörper gegen Dsg1 getestet (in der Abbildung als + dargestellt; die Reaktivität der IgA-Pemphigus-Seren gegen Dsg3 ist als o dargestellt). Zusätzlich wurden 22 gesunde Kontrollpersonen (n=22) untersucht.

Keines der untersuchten Seren von Patienten mit IgA-Pemphigus zeigte IgG-Reaktivität gegen Dsg3 bzw. Dsg1 und Dsc1-3. Alle PNP-Seren zeigten eine deutlich positive IgG-Reaktivität gegen Dsg3. Zudem war eines der drei untersuchten PNP-Seren deutlich IgG-positiv gegen Dsc3 (3.3.2). Bei einem Patienten mit atypischem Pemphigus (Patient #1 mit atypischem Pemphigus; 3.4.1) wurden deutlich erhöhte IgG-Antikörpertiter gegen Dsc1 detektiert. Bei keiner der gesunden Kontrollpersonen war IgG-Reaktivität gegen Dsg3 und Dsc1-3 nachweisbar.

Abb. 3.4b zeigt die IgA-Reaktivität der beschriebenen Patienten gegen Dsg3/1 und Dsc1-3 .



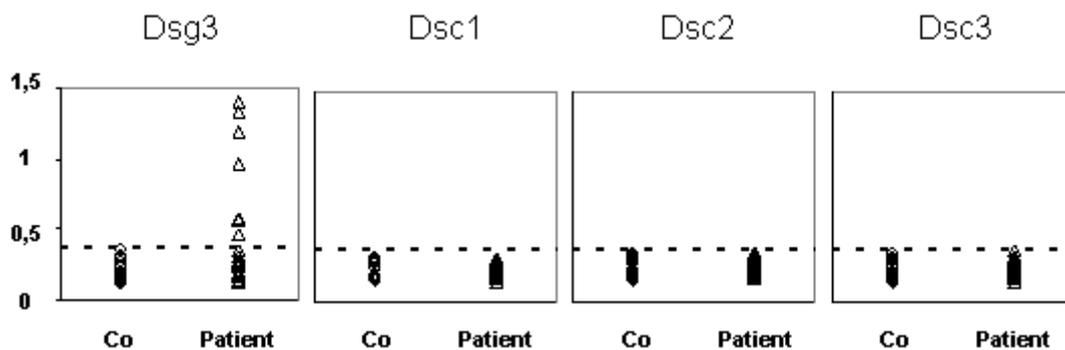
**Abb. 3.4b: IgA-Reaktivität gegen Dsg3/1 und Dsc1-3 bei Patienten mit IgA-Pemphigus, PNP und atypischem Pemphigus**

IgA-Autoantikörper-Reaktivität von Patienten mit IgA-Pemphigus (IgA; n=5), paraneoplastischem Pemphigus (PNP; n=3) und atypischem Pemphigus (atyp; n=2) und 22 gesunden Kontrollpersonen. Drei der an IgA-Pemphigus Erkrankten wurden zudem auf Autoantikörper gegen Dsg1 untersucht (dargestellt als +, die Reaktivität gegen Dsg3 ist als o gezeigt).

Das Serum eines Patienten mit IgA-Pemphigus zeigte eine deutlich positive Reaktivität gegen Dsg1, Dsc1 und Dsc2 (3.3.3). Bei den restlichen IgA-Pemphigus-Seren war keine Reaktivität gegen Dsg3, Dsg1 (Dsg3/1) oder Dsc1-3 detektierbar. Keiner der PNP-Patienten war IgA-positiv gegen die getesteten Konstrukte. Der Patient mit atypischem Pemphigus (#1, 3.4.1), der bereits starke IgG-Reaktivität gegen Dsc1 gezeigt hatte, war zudem auch deutlich IgA-positiv gegen Dsc1. Der zweite Patient mit atypischem Pemphigus (#2, 3.4.2) zeigte positive IgA-Antikörpertiter gegen Dsg3 und Dsc1-3. Alle gesunden Kontrollpersonen lagen deutlich unter dem *Cut-off*-Wert von 0,376.

### 3.2.3 Patienten mit Verdacht auf Pemphigus

Weiterhin wurde ein noch nicht genau charakterisiertes Patientenkollektiv auf IgG- und IgA-Autoantikörper gegen Dsg3 und Dsc1-3 untersucht. Hierbei handelte es sich um Patienten, bei denen der klinische Verdacht auf eine Pemphigus-Erkrankung bestand. In Abb. 3.5a sind die IgG-Autoantikörpertiter der 32 untersuchten Patientenseren dargestellt:

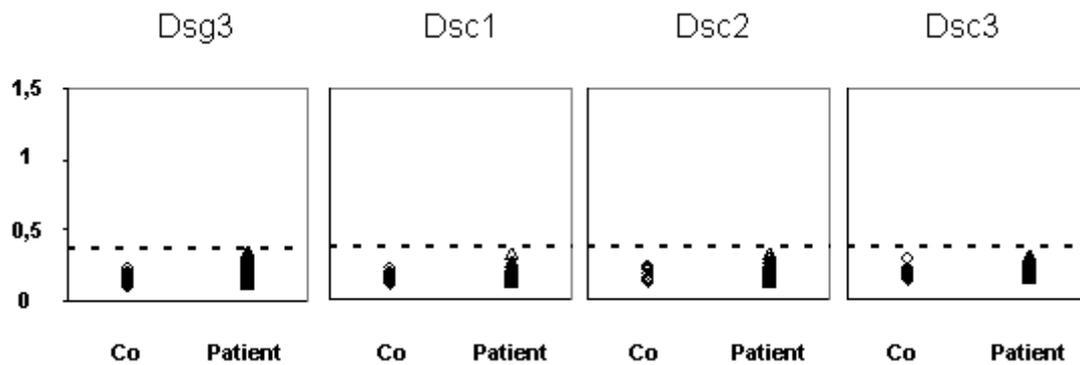


**Abb. 3.5a: Darstellung der IgG-Reaktivität gegen Dsg3 und Dsc1-3 von 32 Patienten mit Verdacht auf eine Pemphigus-Erkrankung**

IgG-Reaktivität der 32 bisher noch nicht genau charakterisierten Patienten (Patient) und 22 gesunden Kontrollpersonen (Co) gegen Dsg3 und Dsc1-3 ermittelt im ELISA.

Wie aus der Graphik ersichtlich, zeigte ein Teil der noch nicht genauer charakterisierten Patienten IgG-Reaktivität gegen Dsg3. Keiner der Patienten war positiv gegen Dsc1-3. Die gesunden Kontrollpersonen zeigten keine Reaktivität gegen Dsg3 und Dsc1-3.

Des weiteren wurden die Seren der noch nicht genauer charakterisierten Patienten auf IgA-Antikörper gegen Dsg3 und Dsc1-3 untersucht (Abb. 3.5b).



**Abb. 3.5b: IgA-Reaktivität gegen Dsg3 und Dsc1-3 von 32 Patienten mit Verdacht auf eine Pemphigus-Erkrankung**

IgA-Reaktivität der 32 noch nicht genau charakterisierten Patienten (Patient), bei denen der Verdacht auf eine Pemphigus-Erkrankung bestand, und 22 gesunden Kontrollpersonen (Co) gegen Dsg3 und Dsc1-3 ermittelt im ELISA.

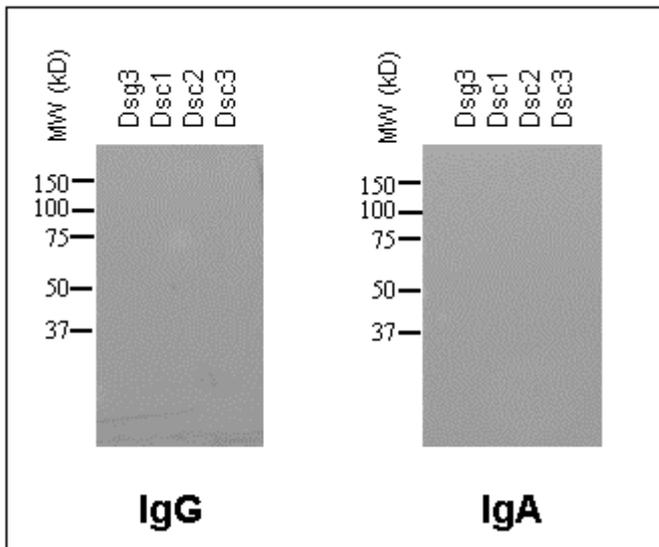
Keiner der untersuchten Patienten zeigte positive IgA-Antikörpertiter gegen Dsg3 oder Dsc1-3. Die gesunden Kontrollpersonen waren ebenfalls negativ gegen alle getesteten Konstrukte.

### 3.3 Testung ausgewählter Patienten mittels Western Blot

Um die im ELISA ermittelten Ergebnisse zu bestätigen, wurden die Seren der Patienten mit positiver Reaktivität gegen Dsc zusätzlich im Western Blot untersucht. Dabei konnten die vorher ermittelten Ergebnisse bestätigt und die Autoantikörper-Reaktivität gegen die jeweiligen Konstrukte als Bande visualisiert werden.

#### 3.3.1 Western Blot einer gesunden Kontrollperson

Neben den zu testenden Patienten wurden auch gesunde Kontrollpersonen mittels Western Blot untersucht. In Abb. 3.6 ist der Blot eines Gesunden gezeigt. Hier ließ sich keine IgG- oder IgA-Reaktivität gegen Dsg3 oder Dsc1-3 nachweisen.



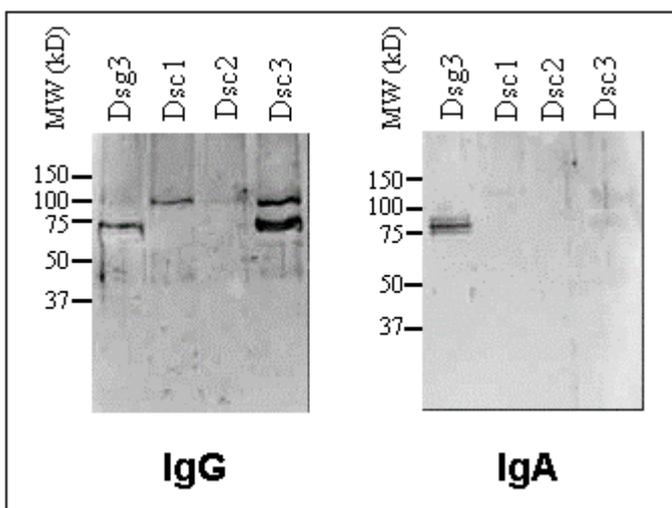
**Abb. 3.6: Western Blot einer gesunden Kontrollperson**

Western Blot auf IgG- und IgA-Autoantikörper gegen Dsg3 und Dsc1-3 bei einer gesunden Kontrollperson. Hier zeigt sich keine Reaktivität gegen die eingesetzten Proteine. Am jeweils linken Bildrand ist das Molekulargewicht dargestellt (MW in kD).

Parallel wurde für jede aufgetragene Proteincharge ein Blot mit dem anti-E-Tag-Antikörper zum Nachweis des Proteins durchgeführt (Abb. 3.2b).

### 3.3.2 Testung des Patienten mit PNP

Einer der getesteten PNP-Patienten zeigte im ELISA deutlich positive IgG-Reaktivität gegen die extrazelluläre Domäne von Dsc3 sowie gegen Dsg3. Diese Messung konnte im Western Blot bestätigt werden. Es zeigten sich deutliche Banden für Dsg3 und Dsc3 unter Verwendung des sekundären anti-human-IgG-Antikörpers; zudem war auch eine positive IgA-Reaktivität gegen Dsg3 nachweisbar (Abb. 3.7).



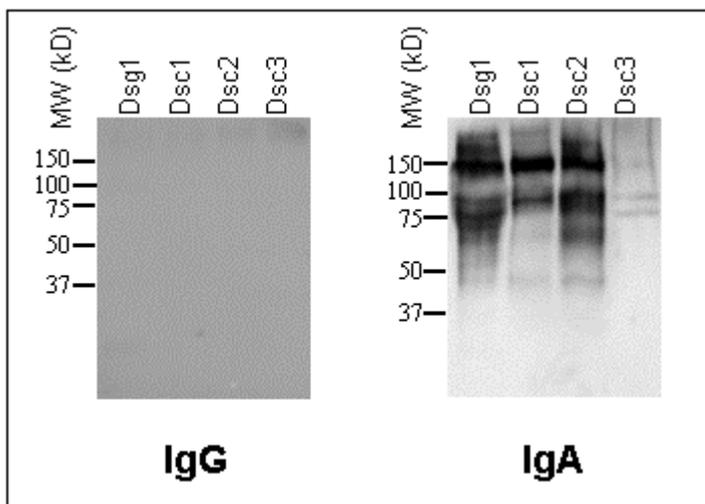
**Abb. 3.7: Testung des PNP-Patienten mittels Western Blot**

In der Untersuchung des PNP-Patienten mittels Western Blot ließ sich unter Verwendung des sekundären anti-human-IgG-Antikörpers eine deutliche Reaktivität gegen Dsg3 und Dsc3 nachweisen. Ebenso ist eine IgA-Reaktivität gegen Dsg3 nachweisbar.

(nach Müller et al., 2009)

### 3.3.3 Testung des Patienten mit IgA-Pemphigus

Einer der getesteten IgA-Pemphigus-Patienten zeigte im ELISA deutlich erhöhte IgA-Autoantikörpertiter gegen Dsg1, Dsc1 und Dsc2. Die im ELISA nachgewiesenen IgA-Reaktivitäten konnten im Western Blot bestätigt werden (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8: Western Blot des IgA-Pemphigus-Patienten**

Der Patient zeigt keine positive IgG-Reaktivität gegen die getesteten Konstrukte Dsg1 und Dsc1-3. Unter Verwendung des sekundären anti-human-IgA-Antikörpers sind deutliche Banden für Dsg1, Dsc1 und Dsc2 detektierbar.

(nach Müller et al., 2009)

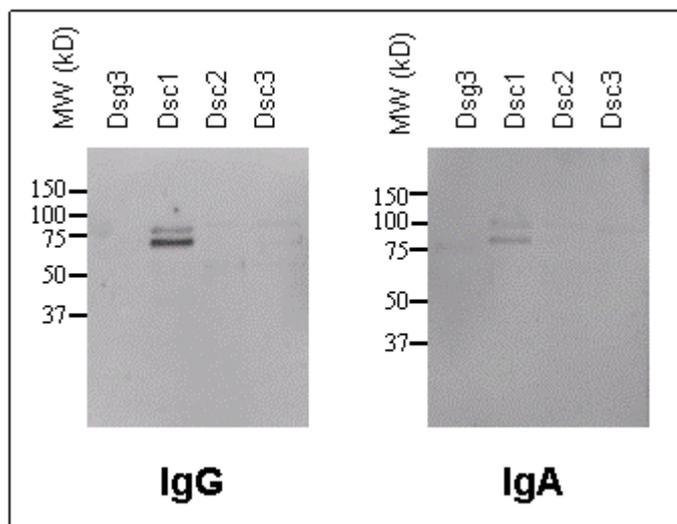
### 3.4 Autoantikörper gegen Dsc bei Patienten mit atypischem Pemphigus

Weiterhin wurden in dieser Arbeit zwei Fälle von Patienten mit atypischen Pemphigus-Erkrankungen untersucht. Hierbei handelt es sich um klinisch polymorphe Manifestationen der Pemphigus-Erkrankung.

#### 3.4.1 Patient #1 mit atypischem Pemphigus

Das Serum von Patient #1 mit atypischem Pemphigus war ein freundliches Geschenk von Prof. Hashimoto, Kurume Universität. Über diesen Fall wurde bereits zu früherer Zeit in der Literatur berichtet (Chorzelski et al., 1994; Hisamatsu et al., 2004). Es handelt sich hierbei um einen 63 Jahre alten männlichen Patienten, der klinisch erythematöse Plaques mit Erosionen und Krusten am Stamm und an den Beinen aufwies; Schleimhäute waren nicht involviert. Histopathologisch zeigten sich subcorneale, akantholytische Bullae mit zahlreichen

polymorphkernigen Leukozyten. In der direkten Immunfluoreszenz waren IgG- und IgA-Antikörper detektierbar, die mit dem obersten Teil der Epidermis reagierte, wo Dsc1 charakteristischerweise exprimiert wird (Chorzelski et al., 1994; Hisamatsu et al., 2004). Chorzelski et al. konnten mittels Western Blot starke IgG- und IgA-Reaktivität gegen bovine Dsc nachweisen (Chorzelski et al., 1994). Des Weiteren wiesen Hisamatsu et al. mittels ELISA IgG- und IgA-Reaktivität gegen im Baculovirus-Expressionssystem exprimiertes, rekombinantes Dsc1 nach (Hisamatsu et al., 2004). Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Neben deutlich positiven IgG- und IgA-Autoantikörpertitern im ELISA (Abb. 3.4) konnte die IgG- und IgA-Antikörperreaktivität ebenfalls im Western Blot visualisiert werden (Abb. 3.9).



**Abb. 3.9: Nachweis von Antikörpern gegen Dsc1 bei Patient #1 mit atypischem Pemphigus im Western Blot**

Im Serum des Patienten mit atypischem Pemphigus (#1) konnte eine deutliche IgG- sowie eine etwas schwächere IgA-Reaktivität gegen Dsc1 mittels Western Blot nachgewiesen werden.

(nach Müller et al., 2009)

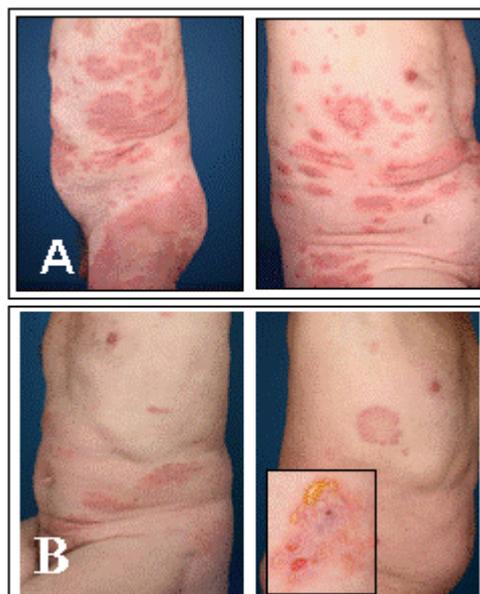
### 3.4.2 Patient #2 mit atypischem Pemphigus

Der zweite Patient mit atypischem Pemphigus, der in dieser Arbeit untersucht wurde, war ein 80-jähriger Mann, der sich mit stark juckenden, scharf begrenzten urtikariellen Plaques mit annulärer Konfiguration und zentraler Abblassung am Stamm und an den Beinen in der Universitätsklinik für Dermatologie Marburg vorstellte. Das klinische Bild sowie die histologische Untersuchung waren vereinbar mit der Diagnose einer eosinophilen Zellulitis, dem sogenannten Wells-Syndrom; hierbei handelt es sich um eine entzündliche Erkrankung unklarer

rer Genese, die durch eine auffallende Gewebseosinophilie charakterisiert ist; fakultativ ist auch eine Blut- und Knochenmarkseosinophilie nachweisbar (Plötz et al., 2000). Unter systemischer Therapie mit Prednisolon sowie Dapson zeigte sich eine deutliche Besserung des Hautbefundes.

Acht Monate später entwickelte der Patient pralle, 1-3 Millimeter große Blasen am Stamm und an den Armen; zudem zeigte sich am Malleolus medialis des rechten Unterschenkels eine etwa 1 cm durchmessende, pralle Blase.

In Abb. 3.10 ist der klinische Verlauf mit den anfänglichen urtikariellen Plaques und den späteren prallen Blasen dargestellt.

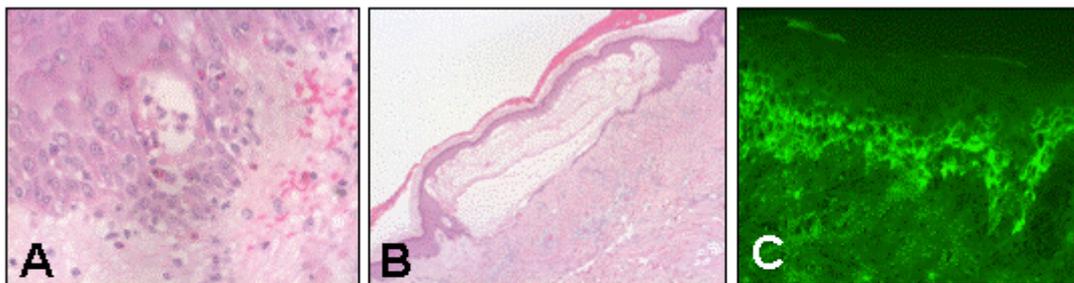


**Abb. 3.10: Klinischer Verlauf von Patient #2 mit atypischem Pemphigus**

Der Patient stellte sich zuerst mit scharf begrenzten, urtikariellen Plaques am Stamm und an den Beinen vor (A). Acht Monate später entwickelten sich pralle, 1-3 mm große Blasen, die sich am Stamm sowie auf den Armen manifestierten. Zudem zeigte sich am Malleolus medialis des rechten Unterschenkels eine ca. 1 cm durchmessende, pralle Blase (B).

(aus Müller et al., 2009)

Dermatohistologisch zeigte sich in der Biopsie eine eosinophile Spongiose der Epidermis sowie eine durch akantolytische Spaltbildung hervorgerufene intraepidermal lokalisierte Blase; in der direkten Immunfluoreszenz konnten interzelluläre epidermale C3-Ablagerungen nachgewiesen werden, wohingegen weder IgA, IgG noch IgM detektierbar waren. In Abb. 3.11 ist der histologische Untersuchungsbefund sowie die direkte Immunfluoreszenz dargestellt.



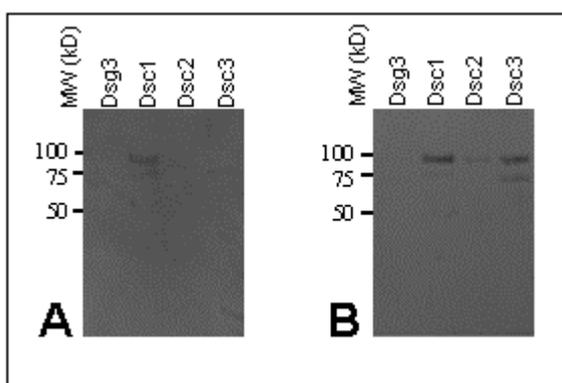
**Abb. 3.11: Histologische Untersuchung und Immunfluoreszenz**

Im histologischen Präparat zeigt sich eine eosinophile Spongiose (A) sowie eine intraepidermale Blase (B). In der direkten Immunfluoreszenz wurden C3-Ablagerungen an den epidermalen Zelloberflächen nachgewiesen (C).

(nach Müller et al., 2009)

Als sich der Patient das erste Mal in der Klinik vorstellte, konnten im ELISA keine erhöhten IgG- und IgA-Autoantikörpertiter gegen Dsc1-3 nachgewiesen werden. In der Western Blot-Analyse war lediglich eine schwache IgA-Reaktivität gegen Dsc1 detektierbar (Abb. 3.12).

Acht Monate später, als der Patient pralle Blasen entwickelt hatte, waren im ELISA IgA-Autoantikörper gegen Dsc1-3 nachweisbar (Abb. 3.4b); eine erneute Western Blot-Untersuchung zeigte nun eine starke IgA-Reaktivität gegen Dsc1 und 3 sowie eine schwache Reaktivität gegen Dsc2. In folgender Abbildung sind die IgA-Western Blots zu den zwei verschiedenen Zeitpunkten gegenübergestellt. Erkennbar ist, dass sich, einhergehend mit der Manifestation von prallen Blasen, deutliche Banden für Dsc1 und Dsc3 zeigen, sowie eine schwache Bande für Dsc2 (Abb. 3.12).

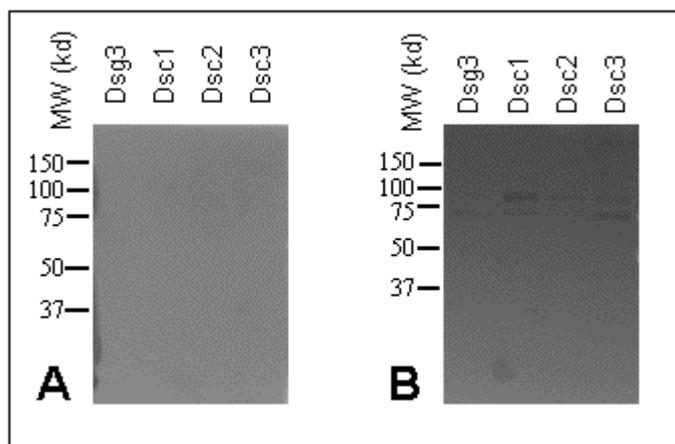


**Abb. 3.12: IgA-Western Blot im Verlauf**

Auf der ersten Western Blot-Untersuchung, deren Serum zum Zeitpunkt der Präsentation des Patienten mit urtikariellen Plaques entnommen wurde, zeigt sich lediglich eine schwache Bande bei Dsc1 (A). Acht Monate später, als der Patient pralle Blasen entwickelt hatte, zeigen sich deutliche Banden bei Dsc1 und 3 sowie eine schwache Bande bei Dsc2 (B).

(aus Müller et al., 2009)

Zusätzlich zur IgA-Reaktivität wurde auch die IgG-Reaktivität im Western Blot untersucht. Bei der ersten Vorstellung des Patienten zeigten sich keine Banden im Western Blot; zum Zeitpunkt der Blasenmanifestation war eine schwache IgG-Reaktivität gegen Dsc1 und 3 und eine sehr schwache IgG-Reaktivität gegen Dsc2 detektierbar (Abb. 3.13).



**Abb. 3.13: IgG-Western Blot im Verlauf**

Bei Erstvorstellung des Patienten zeigen sich keine Banden gegen Dsc1-3 oder Dsg3 (A). Zum Zeitpunkt der Blasenmanifestation zeigt sich eine schwache IgG-Reaktivität gegen Dsc1 und 3 sowie eine sehr schwache IgG-Reaktivität gegen Dsc2 (B).

Unter einer systemischen Therapie mit Prednisolon zeigte sich eine Stabilisierung und diskrete Besserung des Hautbefundes. Die Klinik in Zusammenschau mit der histologischen Untersuchung sowie der immunserologischen Diagnostik waren mit der Diagnose einer atypischen Pemphigus-Variante vereinbar.

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, einen Dsc-ELISA zu etablieren, um mögliche Reaktivitäten gegen Dsc bei Patienten mit Pemphigus zu untersuchen. Sollte das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen Dsc bei spezifischen Pemphigus-Erkrankungen nachzuweisen sein, könnte der ELISA gezielt zur Diagnosestellung dieser Erkrankungen beitragen. Hierfür musste zunächst rekombinantes Dsc1-3 im Baculovirus-Expressionssystem hergestellt werden. Die Voraussetzung hierfür wurde von Prof. Hashimoto, Kurume Universität, geschaffen, der freundlicherweise die Vektoren für die rekombinanten Dsc zur Verfügung stellte. Diese wurden von Dr. Ralf Müller mit linearisierter Baculovirus-DNA in SF-21-Zellen kotransfiziert.

Die Reaktivität von Pemphigus-Patienten gegen Dsc wurde bereits in früheren Studien untersucht; so wurde bereits 1993 von Dmochowski et al. eine Studie zur Reaktivität von Seren von Patienten mit PV, PF, FS und BP gegen Dsc durchgeführt (Dmochowski et al., 1993). Hierbei wurden die Autoantikörper allerdings mittels Western Blot einer bovinen Desmosomen-Präparation untersucht. Es zeigten sich positive Reaktivitäten bei 25 % der PV-Seren, 7 % der PF-Seren, 53 % der FS-Seren sowie bei 5 % der gesunden Kontrollpersonen. Daraufhin wurden weitere Studien durchgeführt, in denen die Reaktivität von Pemphigus-Patienten gegen Dsc untersucht wurde. So berichteten Hashimoto et al. über zwei Fälle von Patienten mit Pemphigus vegetans, Typ Hallopeau, die ebenfalls gegen Dsc im Western Blot einer bovinen Desmosomen-Präparation reagierten (Hashimoto et al., 1994). Dmochowski et al. konnten 1995 zeigen, dass einige PV-, PF- und FS-Patienten neben positiven Reaktivitäten gegen Dsc in bovinen Desmosomen-Präparationen auch gegen bovine Fusionsproteine (Dsc1b, Dsc2b, Dsc3b) reagierten (Dmochowski et al., 1995). In diesen Studien konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, dass die Patienten auch gegen humanes Dsc1-3 reagierten. Die Signifikanz der Reaktivitäten gegen bovine Dsc blieb also ungewiss. Hashimoto et al berichteten in einer folgenden Studie von einem PV-Patienten, bei dem die positive anti-Dsc-Reaktivität auch im Western Blot mit humanen epidermalen Extrakten demonstriert werden konnte (Hashimoto et al., 1995b). Zudem konnten Dmochowski et

al. in einem Serum eines PF-Patienten IgG4-Autoantikörper gegen Dsc1a mittels Immunfluoreszenz auf mit Dsc1-3 transfizierten COS-7- und NIH 3T3-3 Zellen nachweisen (Dmochowski et al., 1999).

Daraufhin etablierten Hisamatsu et al. einen ELISA zur Detektion von IgG- und IgA-Autoantikörpern gegen Dsc, für welchen die rekombinanten Dsc mittels des Baculovirus-Expressionssystems hergestellt wurden (Hisamatsu et al., 2004). Diese Methode hatte sich bereits im Rahmen der Diagnostik zur Detektion von anti-Dsg1- und anti-Dsg3-Autoantikörpern in Seren von Patienten mit PV und PF als sehr sensitives und spezifisches Verfahren erwiesen (Amagai et al., 1999b; Harman et al., 2000). Zusätzlich zur Detektionsmethode des ELISA testete die Arbeitsgruppe ausgewählte Patienten auch mittels Immunfluoreszenz; hierfür wurde Dsc1-3 auf der Zelloberfläche von COS-7-Zellen exprimiert und die Reaktivität der Patientenserum mittels Immunfluoreszenz ermittelt. In dieser Studie zeigte sich, dass Reaktivität gegen Dsc nur in Fällen von atypischem Pemphigus, IgA-Pemphigus und PNP nachgewiesen werden konnte. Die Fälle mit atypischem Pemphigus waren durch klinisch polymorphe Phänotypen charakterisiert, die bereits zuvor in der Literatur beschrieben worden waren (Chorzelski et al., 1994; Weston et al., 1998; Gooptu et al., 1999). Des Weiteren wurden anti-Dsc-Autoantikörper nur in vereinzelt Fällen von Pemphigus-Erkrankungen detektiert, beispielsweise bei einem Patienten mit Pemphigus herpetiformis (Kozłowska et al., 2003), einem Patienten mit einem klinischen Phänotypen des IEN-Typ des IgA-Pemphigus (Heng et al., 2006), einem Patienten mit einer bullösen Hauterkrankung, der zudem unter Palmoplantarkeratosen litt (Bolling et al., 2007) sowie einem Patienten mit PNP (Preis et al., 2004). Des Weiteren wurde Dsc1 als Autoantigen des SPD-Typs des IgA-Pemphigus identifiziert (Hashimoto et al., 1997) und in weiteren Fällen von IgA-Pemphigus detektiert (Yasuda et al., 2000; Hashimoto et al., 2002; Kopp et al., 2006).

Die Autoantikörperprofile europäischer Pemphigus-Patienten gegen Dsc waren hingegen bisher weitestgehend unbekannt. Diese zu ermitteln war das Ziel dieser Arbeit.

#### **4.1 Etablierung des ELISA**

Die Etablierung des ELISA zur Detektion von Autoantikörpern gegen Dsc1-3 orientierte sich an dem bereits in der Arbeitsgruppe etablierten ELISA zur Ermittlung von Autoantikörpern gegen die gesamte extrazelluläre Domäne von Dsg3 (Dsg3EC1-5). Für diesen ELISA war von Müller et al. bereits ein *Cut-off*-Wert ermittelt worden; dieser konnte mittels einer ROC-Kurve ermittelt werden, welche anhand eines großen Patientenkollektivs mit Hilfe der Software von SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) erstellt worden war. Das Patientenkollektiv setzte sich hierbei aus 123 Patienten, die an PV erkrankt waren, sowie aus 40 gesunden Kontrollpersonen zusammen (Müller et al., 2006). Für die Ermittlung einer eigenen ROC-Kurve für die rekombinanten Dsc standen bisher leider noch nicht genügend Positivkontrollen zur Verfügung; um das System zu optimieren, sollte in der Zukunft eine solche ROC-Kurve auch für den Dsc-ELISA erstellt werden; auf diese Art und Weise könnte ein spezifischer *Cut-off*-Wert für die Dsc-Proteine ermittelt werden, was eine noch genauere Beurteilung der Autoantikörperprofile gegen Dsc erlauben würde. Des Weiteren sollte die Berechnung eines PIV (*protein index value*) für den Dsc-ELISA etabliert werden, mit dessen Hilfe die Autoantikörpertiter der Patientenseren besser im Verhältnis von Negativ- zu Positivkontrolle ermittelt werden können.

#### **4.2 Versuchsmodifizierung**

Während der anfänglichen Versuchsdurchführungen des ELISA, der sich über einen Zeitraum von drei Tagen erstreckte, fiel auf, dass manche PV-Patienten sowie eine gesunde Kontrollperson auffällig hohe Autoantikörper-Titer gegen alle drei Dsc-Konstrukte sowie ebenfalls gegen die gesamte extrazelluläre Domäne von Dsg3 zeigten. Die Validität dieser Ergebnisse erschien fragwürdig, da in der in 2004 veröffentlichten Studie von Hisamatsu et al. 45 Patienten mit „klassischem“ Pemphigus, i.e. 24 Fälle mit PF und 21 Fälle mit PV, keine Reaktivität gegen Dsc gezeigt hatten; zudem konnte in dieser Studie auch bei keiner der 23 gesunden Kontrollpersonen Reaktivität gegen Dsc ermittelt werden. Bei den Patienten dieser Studie, bei denen Autoantikörper gegen Dsc detektierbar waren, handelte es sich um atypische Fälle von Pemphigus sowie Patienten mit

PNP und IgA-Pemphigus, die maximal auf zwei der drei Dsc-Konstrukte positiv reagierten. Des Weiteren zeigten in dieser Studie drei der 21 untersuchten Patienten mit brasilianischem PF (FS) IgG-Reaktivität gegen alle drei Dsc-Konstrukte; daraufhin wurde ein Immunadsorptions-Assay unter Verwendung von rekombinantem Dsg1 und Dsg3 durchgeführt, durch den die Immunfluoreszenz-Reaktivität der FS-Seren mit Keratinozyten-Zelloberflächen beinahe komplett adsorbiert werden konnte (Hisamatsu et al., 2004). Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit ebenfalls eine Präinkubation mit den Seren durchgeführt, und zwar mit den rekombinanten Proteinen Dsg1 und Pemphaxin (3.1.3.2). Bei den Patienten mit PV und bei der gesunden Kontrollperson konnten die Reaktivitäten gegen die rekombinanten Dsc nach der Präinkubation nicht mehr nachgewiesen werden, was darauf hinwies, dass es sich um unspezifische Reaktivitäten gegen mitexprimiertes und mitaufgereinigtes Protein in der Präparation der rekombinanten Dsc gehandelt haben musste. Anhand der Präinkubationsmethode konnte also zwischen Reaktivität gegen in der Proteinlösung enthaltene unspezifische Proteine und spezifischer Reaktivität gegen Dsc unterschieden werden. Die ELISA-Untersuchung mit Präinkubation verlängert die Versuchsdurchführung allerdings um einen Tag und ist demzufolge nicht so praktisch anwendbar wie der Versuchsablauf über drei Tage. Aufgrund dessen wurden die Patientenserumproben zunächst mittels des dreitägigen Versuchsablaufes untersucht und bei positiver Reaktivität erneut im Präinkubations-ELISA getestet.

#### **4.3 Autoantikörper-Reaktivitäten von PV-Patienten gegen Dsc**

In dieser Arbeit konnten bei allen Patienten mit PV, die sich im akuten und chronischen Stadium der Erkrankung befanden, positive IgG-Autoantikörpertiter gegen Dsg3EC1-5 nachgewiesen werden. Diese Titer korrelierten mit der klinischen Aktivität des PV; sie waren in der Gruppe der akut Erkrankten durchschnittlich am höchsten und wurden sukzessive weniger bei chronisch Erkrankten und bei Patienten in Remission. Dies bestätigt erneut die Ergebnisse vorheriger Studien zur Reaktivität von PV-Patienten, die zeigen konnten, dass die Autoantikörpertiter gegen Dsg3EC1-5 mit der klinischen Aktivität der Erkrankung korrelieren (Ishii et al., 1997; Müller et al., 2006 und 2008). Die Untersuchungen

zur Reaktivität der PV-Patienten gegen die drei Dsc-Isoformen zeigten im Gegensatz dazu, dass bei keinem der untersuchten PV-Seren IgG-Reaktivität gegen die drei verschiedenen Dsc-Isoformen nachzuweisen war. Hierbei machte es auch keinen Unterschied, ob sich die Patienten im akuten oder chronischen Stadium der Pemphigus-Erkrankung befanden oder in Remission; in keinem der untersuchten Stadien war IgG-Reaktivität gegen Dsc1-3 nachweisbar. Folglich waren auch die drei untersuchten klinischen Phänotypen (mukosal, mukokutan, kutan) alle negativ gegen Dsc. Diese Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen von Hisamatsu et al., die in einem kleineren Kollektiv von PV-Patienten ebenfalls keine Reaktivitäten gegen Dsc1-3 nachweisen konnten (Hisamatsu et al., 2004). Zusätzlich konnte in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Reaktivitäten europäischer Pemphigus-Patienten auch in PV-Patientenkollektiven mit unterschiedlicher klinischer Aktivität und verschiedener klinischer Manifestation negativ gegen Dsc sind.

#### **4.4 Autoantikörper-Reaktivitäten von Patienten mit IgA-Pemphigus**

Weiterhin wurden insgesamt fünf Patienten mit IgA-Pemphigus auf Autoantikörper gegen Dsc1-3 untersucht. Hierbei konnte bei einem Patienten IgA-Reaktivität gegen Dsc1 und 2 sowie gegen Dsg1 nachgewiesen werden. Die anderen Patienten reagierten gegen keines der getesteten Proteine. Nachdem Dsc1 als Autoantigen des SPD-Typs des IgA-Pemphigus identifiziert worden war (Hashimoto et al., 1997) und in verschiedenen Fällen von IgA-Pemphigus IgA-Autoantikörper gegen Dsg1 oder Dsg3 nachgewiesen werden konnten (Prost et al., 1991; Wang et al., 1997; Karpati et al., 2000; Hashimoto et al., 2001), schlug Amagai als neue Einteilung des IgA-Pemphigus folgende vor: SPD-Typ (Autoantigen Dsc1), IEN-Typ (Autoantigen unbekannt), IgA-Pemphigus vulgaris (Autoantigen Dsg3), IgA-Pemphigus foliaceus (Autoantigen Dsg1) (Amagai, 1999a). Die Erkrankung des IgA-Pemphigus erscheint jedoch heterogener als bisher angenommen. Die Demonstration von IgA-Autoantikörpern gegen Dsg1 und Dsc1 bei einem Patienten mit IgA-Pemphigus (Kopp et al., 2006) und die hier vorliegende Arbeit mit der Detektion von Autoantikörpern gegen Dsg1, Dsc1 und Dsc2 stellt die bisherige Einteilung in Frage,

da sich solch ein Fall von IgA-Pemphigus in keine Gruppe der bestehenden Klassifikation einordnen lässt. So konnten in einer neueren Studie bei einem Patienten mit dem Phänotyp eines IEN-Typs des IgA-Pemphigus IgA- und IgG-Autoantikörper gegen Dsc1 nachgewiesen werden (Heng et al., 2006). Möglicherweise existiert zusätzlich, wie bereits von Hashimoto vorgeschlagen, neben den bisher vorgestellten Pemphigus-Entitäten auch ein IgG/IgA-Pemphigus (Hashimoto, 2003).

#### **4.5 Autoantikörper-Reaktivitäten von Patienten mit PNP**

Die drei Patienten mit PNP, die in dieser Arbeit untersucht wurden, zeigten deutlich positive IgG-Reaktivitäten gegen Dsg3 im ELISA. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen einer Studie von Amagai et al., in der bei der Untersuchung von 25 Patienten mit PNP bei allen positive IgG-Reaktivität gegen Dsg3 nachgewiesen werden konnte (Amagai et al., 1998). Zudem war einer der PNP-Patienten, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, deutlich IgG-positiv gegen Dsc3. Autoantikörper gegen Dsc in Fällen von Patienten mit PNP waren bereits von Hisamatsu et al. sowie von Preisz et al. beschrieben worden (Hisamatsu et al., 2004; Preisz et al., 2004). So reagierten in der Studie von Hisamatsu et al. drei der 22 getesteten PNP-Seren positiv gegen Dsc (Hisamatsu et al., 2004); Preisz et al. berichteten über einen PNP-Patienten, der eine Exazerbation des PNP nach Therapie mit Cyclophosphamid erlitten hatte; bei diesem Patienten waren ebenfalls anti-Dsc-Autoantikörper detektierbar (Preiz et al., 2004).

#### **4.6 Autoantikörper-Reaktivitäten von Patienten mit atypischem Pemphigus**

In einer Studie von Hisamatsu et al. wurde bereits beschrieben, dass IgG- und IgA-Reaktivität gegen Dsc vor allem bei Patienten mit atypischen Pemphigus-Erkrankungen, die sich klinisch polymorph darstellten, nachgewiesen werden konnte (Hisamatsu et al., 2004). Dieses konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden; zwei Patienten mit atypischem Pemphigus reagierten positiv gegen Dsc; einer dieser Patienten war bereits von Chorzelski et al. beschrieben

worden und zeigte im ELISA deutliche IgG- und IgA-Reaktivität gegen Dsc1, die auch im Western Blot bestätigt werden konnte.

Der zweite atypische Pemphigus-Patient wurde in der Universitätsklinik für Dermatologie Marburg behandelt und zeigte zunächst das klinische Bild einer eosinophilen Zellulitis, dem sog. Wells-Syndrom. Acht Monate später entwickelte er pralle Blasen am Stamm sowie an den Armen; einhergehend mit dieser Blasenbildung konnten beim Patienten IgA-Autoantikörper gegen Dsc1 und Dsc3 nachgewiesen werden, sowie schwach auch gegen Dsc2.

#### **4.7 Dsc als Autoantigene der Pemphigus-Erkrankung**

Wie aus den Ergebnissen dieser Arbeit sowie aus zuvor durchgeführten Arbeiten, die die Reaktivitäten von Pemphigus-Patienten gegen Dsc untersuchten, deutlich wird, scheinen die Dsc keine häufigen Autoantigene der Pemphigus-Erkrankung darzustellen. Reaktivität gegen humanes Dsc konnte in großen Kohorten von Patienten mit PV, welcher die häufigste Form des Pemphigus darstellt, nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten in dieser Arbeit in einer Gruppe von 32 Patienten mit Verdacht auf Pemphigus keine Autoantikörper gegen Dsc gefunden werden. Demgegenüber konnten allerdings Autoantikörper gegen Dsc in Fällen von Patienten mit IgA-Pemphigus, PNP und atypischen Pemphigus-Erkrankungen nachgewiesen werden.

Es bleibt zu klären, warum Dsg Hauptautoantigene der Pemphigus-Erkrankung darstellen, wohingegen Dsc nur in seltenen Fällen als Antigene des Pemphigus nachweisbar sind, da beide Glykoproteine zu den desmosomalen Cadherinen zählen und entscheidende Funktionsproteine der interzellulären Adhäsion darstellen.

Anti-Dsc-Autoantikörper werden möglicherweise aufgrund des Phänomens des *Epitope spreading* generiert. Dieses Phänomen wurde bereits in anderen Autoimmunerkrankungen wie der multiplen Sklerose (McRae et al., 1995), dem insulinabhängigen Diabetes mellitus (Söhnlein et al., 2000) und dem systemischen Lupus erythematoses (James et al., 1995) beschrieben. Auch wurde es in Bezug auf PV und PF von einigen Arbeitsgruppen bisher genauer beleuchtet: Li et

al. konnten zeigen, dass Patienten mit endemischem PF im präklinischen Stadium, Patienten mit aktiver Erkrankung und solche in Remission jeweils bestimmte Epitope des Dsg1 erkennen; im Verlauf der Erkrankung findet ein intramolekularer *Epitop-Shift* statt (Li et al., 2003). Die Rolle des *Epitope Spreading* im PV wurde von Salato et al. und von Müller et al. genauer beleuchtet. Salato et al. konstatierten, dass zunächst ein intramolekulares *Epitope Spreading* innerhalb des Dsg3 stattfindet, und daraufhin ein intermolekulares *Epitope Spreading* zum Dsg1 vollzogen wird (Salato et al., 2003). Müller et al. konnten zeigen, dass die IgG-Reaktivität gegen den NH<sub>2</sub>-Terminus und die EC2-4 von Dsg3 mit klinisch aktivem PV assoziiert ist und dass die IgG-Reaktivität gegen die EC1-4 mit mukosalem PV vergesellschaftet ist und bei kutanem PV vermindert ist (Müller et al., 2008).

Diesen Erkenntnissen zufolge ist es ebenfalls sehr wahrscheinlich, dass auch die Bildung von Dsc-spezifischen Autoantikörpern dem Prinzip des *Epitope spreading* unterliegt. Man würde erwarten, dass anti-Dsc-Autoantikörper vor allem bei lang andauernden Pemphigus-Erkrankungen nachweisbar sind. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, wenn man die Ergebnisse dieser Arbeit in Betracht zieht, in der festgestellt wurde, dass Patienten in verschiedenen Krankheitsstadien des PV, also auch mit langandauernder Erkrankung, keinerlei Autoantikörper gegen Dsc aufweisen. Gegenüber dem PV stellen Dsc allerdings Autoantigene beim IgA-Pemphigus, PNP sowie bei atypischen Pemphigus-Erkrankungen dar. Der Grund hierfür ist noch nicht geklärt. Beim PNP scheint allerdings, im Vergleich zu anderen Pemphigus-Varianten wie beispielsweise dem PV, eine größere Tendenz zum *Epitope Spreading* zu bestehen, da bei diesem neben den anti-Dsg3- und ggf. anti-Dsg1-Autoantikörpern ein vielfältiges Repertoire an Antikörpern gegen Mitglieder der Plakin-Familie sowie gegen Bestandteile der Hemidesmosomen nachweisbar ist (Oursler et al., 1992; Hashimoto et al., 1995a; Amagai et al., 1998; Kiyokawa et al., 1998; Proby et al., 1999). Wie bereits in 1.3.4 erwähnt, könnte die Entstehung des PNP möglicherweise auf dem Mechanismus des *Antigen Mimicry* beruhen, und zwar in dem Sinne, dass die jeweiligen Tumoren Epitope präsentieren, die den desmosomalen und Plakin-Antigenen sehr ähnlich sind, woraufhin eine primäre

Immunantwort gegen die Tumorantigene induziert wird, deren Autoantikörper gegen desmosomale bzw. Plakin-Strukturen kreuzreagieren (Oursler et al., 1992). Entscheidende Faktoren für die Entwicklung des *Epitope Spreading* liegen wahrscheinlich in der Struktur und Immunogenität der Antigene, die dem Prozess der Autoimmunität und der Immunantwort des Organismus unterliegen (Tchernev et al., 2006). Endogene Antigene, wie solche, die von einem Tumor generiert werden, induzieren möglicherweise leichter *Antigen Mimicry* und *Epitope spreading*, da ihre vollständige Eliminierung durch den Organismus nur selten möglich ist und sie durch ihre genetische Instabilität einer kontinuierlichen Entwicklung unterliegen (Tchernev et al., 2006). So könnte in solchen Fällen eine kontinuierliche Antigen-Stimulation vorliegen, die vielleicht eher zum *Antigen Mimicry* und zum *Epitope Spreading* prädisponiert, als die Präsentation exogener Antigene, mit denen der Körper beispielsweise im Rahmen einer bakteriellen, viralen oder parasitären Infektion oder bei der Gabe von Medikamenten in der Regel nur über einen kürzeren Zeitraum konfrontiert wird (Tchernev et al., 2006). In dieser Arbeit konnten, ebenso wie in den Studien von Hisamatsu et al. und Preisz et al. bei Patienten mit PNP Autoantikörper gegen Dsc detektiert werden (Hisamatsu et al., 2004; Preisz et al., 2004), deren Generierung möglicherweise dem Mechanismus des intermolekularem *Epitope spreading* unterliegt.

Interessanterweise wurden anti-Dsc-Antikörper neben den Erkrankungen IgA-Pemphigus und PNP vor allem bei Patienten mit atypischen Pemphigus-Erkrankungen detektiert, die durch einen klinisch polymorphen Phänotypen gekennzeichnet waren und sich in bisher bestehende Pemphigus-Klassifikationen nicht sicher einordnen ließen (Chorzelski et al., 1994; Weston et al., 1998; Gooptu et al., 1999; Hisamatsu et al., 2004). In dieser Arbeit konnten ebenfalls bei einem Patienten mit atypischem Pemphigus anti-Dsc-Autoantikörper im Verlauf seiner Erkrankung nachgewiesen werden. Der Entwicklung der Pemphigus-Erkrankung ging bei diesem Patienten die Erkrankung einer eosinophilen Zellulitis, dem sogenannten Wells-Syndrom, voraus. Dieser Fall scheint bisher einzigartig zu sein, da in der Literatur bislang kein solcher Fall eines atypischen Pemphigus, der sich anschließend an eine eosinophile Zellulitis entwickelt hat,

berichtet worden ist. Hier stellt sich die Frage, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen der Ersterkrankung und der darauffolgenden Entwicklung des Pemphigus mit den anti-Dsc-Antikörpern besteht.

Chan et al. beleuchteten den Mechanismus des *Epitope Spreading* vor allem unter dem Aspekt, dass primäre autoimmune sowie inflammatorische Prozesse einen Gewebeschaden verursachen, so dass daraufhin gewisse Proteinkomponenten, die vorher immunologisch „versteckt“, i.e. nicht zugänglich waren, durch eben diese Prozesse zum Vorschein gebracht werden und daraufhin eine sekundäre Immunantwort triggern (Chan et al., 1998). Sie stellten in diesem Zusammenhang verschiedene Fälle von inflammatorischen Erkrankungen vor, denen eine bullöse Autoimmundermatose folgte, wie beispielsweise eine Studie von fünf Patienten mit Stevens-Johnson-Syndrom, eine akute inflammatorische Erkrankung der Mukosa und der Haut, die später an einem vernarbenden okulären Pemphigoid erkrankten (Chan et al., 1991), oder ein Bericht über einen Patienten mit einer langen Krankengeschichte einer Dermatitis herpetiformis, der an einem BP erkrankte (Setterfield et al., 1997). Dieses Phänomen wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben; Bowen et al. sowie auch Marzano et al. vermuteten einen Zusammenhang zwischen der vorausgehenden Erkrankung einer lichenoiden Dermatitis und der die Manifestation eines PNP, der dieser folgte (Bowen et al., 2000; Marzano et al., 2001). Diese in der Literatur bereits mehrfach beschriebene mögliche Assoziation inflammatorischer Erkrankungen mit bullösen Autoimmundermatosen wirft die Frage auf, ob vielleicht auch bei dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Patienten mit eosinophiler Zellulitis ein Gewebeschaden die Dsc-Antigene möglicherweise erst immunologisch zugänglich gemacht hat und dadurch die Pemphigus-Erkrankung ausgelöst werden konnte.

Über die eigentlich auslösenden Ereignisse der Pemphigus-Erkrankung sowie von Autoimmunerkrankungen generell ist bisher nur wenig bekannt. Die Identifikation solcher und ihre gezielte Reduktion könnte möglicherweise die Manifestation der Pemphigus-Erkrankung signifikant reduzieren (Tchernev et al., 2006).

#### **4.8 ELISA als diagnostisches Tool zur Detektion von anti-Dsc-Antikörpern**

Der ELISA hat sich als geeignete diagnostische Maßnahme zur Detektion von Autoantikörpern gegen Dsg3 und Dsg1 in Seren von Patienten mit Pemphigus erwiesen; verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass es sich beim ELISA zur Detektion von anti-Dsg-Autoantikörpern um ein sehr sensitives und spezifisches Verfahren handelt (Amagai et al., 1999b; Harmann et al., 2000; Müller et al., 2006). Ziel war es, einen ebenso geeigneten ELISA zur Detektion von anti-Dsc-Autoantikörpern bei Pemphigus-Erkrankungen zur Verfügung zu stellen. In dieser Arbeit sowie in der Studie von Hisamatsu et al. wurden unter anderem auch Patienten mit dem SPD-Typ des IgA-Pemphigus untersucht, die bekannterweise Autoantikörper gegen Dsc1 bilden (Hashimoto et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit war von einem Patienten bekannt, dass es sich um einen SPD-Typ des IgA-Pemphigus handelte; im ELISA war bei diesem Patienten aber weder Reaktivität gegen die extrazelluläre Domäne von Dsc1 noch gegen die anderen getesteten rekombinanten Proteine nachweisbar (i.e. Dsg1, Dsg3, Dsc2, Dsc3). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Hisamatsu et al. gemacht, die bei der Testung von acht Seren von Patienten mit dem SPD-Typ des IgA-Pemphigus nur bei einem Patienten Reaktivität gegen Dsc1 im ELISA detektieren konnten, wohingegen alle acht Patientenserum Dsc1-positiv in der Testung mittels COS-7-Zellen waren (Hisamatsu et al., 2004). Scheinbar können Dsc nicht mit der gleichen Effizienz wie Dsg im Baculovirus-Expressionssystem exprimiert werden. Im Baculovirus-Expressionssystem exprimiertes Dsg1 und Dsg3 scheint alle entscheidenden Epitope zu enthalten, die von klassischen Pemphigus-Seren erkannt werden (Ishii et al., 1997; Amagai et al., 1999b). Möglicherweise wurden entscheidende Epitope des Dsc1, die vom SPD-Typ des IgA-Pemphigus erkannt werden, nach Expression im Baculovirus-Expressionssystem nicht präsentiert. Denkbar wäre, dass die Dsc-Moleküle nicht die korrekte Konformation im Baculovirus-Expressionssystem erhalten, oder die Assoziation mit anderen Molekülen benötigen, um ihre korrekte Tertiärstruktur zu erhalten (Hisamatsu et al., 2004). In der Literatur wurde beispielsweise beschrieben, dass proteolytische Prozessierungen in Insektenzellen manchmal nicht effizient vollzogen werden (Kuroda et al., 1991). Dies

könnte einen entscheidenden Einfluss auf die nachfolgende Tertiärstruktur und somit auf die präsentierten Epitope haben. Altmann et al. berichteten zudem, dass sich die Glykosilierung in Insektenzellen in wesentlichen Aspekten von der in Säugerzellen unterscheidet (Altmann et al., 1999). Palomares et al. konnten neue Insektenzelllinien demonstrieren, bei welchen die Glykosilierung vollständiger vollzogen wurde als bei den Zellen der Insektenzelllinie *Trichoplusia ni*, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden (Palomares et al., 2003). Zwar konnte für Dsg1 und Dsg3 gezeigt werden, dass konformationelle Epitope unabhängig von der Glykosilierung der Proteine exprimiert werden (Amagai et al., 1995c), aber über Dsc ist in dieser Hinsicht weitaus weniger bekannt. Möglicherweise könnte die Glykosilierung der Dsc-Epitope eine entscheidende Rolle bei ihrer Erkennung durch bestimmte Autoantikörper spielen. Hier wäre es in Zukunft interessant zu evaluieren, ob Dsc, die unter Verwendung einer anderen Insektenzelllinie synthetisiert worden sind, möglicherweise Epitope enthalten, die von den Antikörpern aus IgA-Pemphigus-Seren des SPD-Typs erkannt werden.

Es wäre sehr wünschenswert, wenn man den ELISA zur Detektion von anti-Dsc-Antikörpern in dieser Hinsicht noch perfektionieren könnte, da es sich beim ELISA um ein diagnostisches Tool handelt, mit dem eine große Anzahl von Seren gleichzeitig getestet werden kann und dessen Durchführung relativ einfach und so für den klinischen Alltag sehr praktikabel ist. Zudem handelt es sich beim ELISA um einen quantitativen Assay, durch den spezifisch Antikörpertiter gemessen werden können. Vorteilhaft ist auch, dass die im ELISA ermittelten Ergebnisse als objektiv angesehen werden können, da die OD-Werte automatisch gelesen und als numerischer Wert angegeben werden (Harman et al., 2000).

Die Methode der Immunfluoreszenz mit COS-7-Zellen, die mit Dsc1-3 transfiziert wurden, kann nicht als ideale diagnostische Maßnahme angesehen werden; Dmochowski et al. berichteten hierzu, dass einige der Seren, die sie mittels COS-7-Zellen auf Reaktivität gegen Dsc testen wollten, teilweise sehr hohe Hintergrund-Aktivität allein schon auf nicht-transfizierten COS-7-Zellen zeigten, welche sich auch nicht mittels Präadsorptionsmethoden eliminieren ließ (Dmo-

chowski et al., 1999). Zudem handelt es sich hierbei um eine qualitative Untersuchung, mit der das Screening vieler Patientenseren zur gleichen Zeit nicht so einfach möglich ist (Harman et al., 2000).

#### **4.9 Pathogenität der anti-Dsc-Autoantikörper**

Für anti-Dsg3- sowie anti-Dsg1-Autoantikörper konnte bereits demonstriert werden, dass es sich um pathogene Antikörper handelt, da ihre Injektion in neonatale Mäuse eine Blasenbildung induzierte (Amagai et al., 1992; Ding et al., 1999). Zudem konnten Supapannachart et al. in einer früheren Studie zum IgA-Pemphigus zeigen, dass die Seren von zwei Patienten mit dem SPD-Typ des IgA-Pemphigus eine Akantholyse in einer Haut-Explantat-Kultur induzieren konnten (Supapannachart et al., 1993).

Diese Erkenntnisse werfen unvermeidlich die Frage auf, ob es sich auch bei den anti-Dsc-Autoantikörpern um pathogene Antikörper handelt, die ebenfalls in der Lage sind, eine Blasenbildung zu induzieren. In einer kürzlich publizierten Studie konnten Chen et al. zeigen, dass Dsc3 für die epidermale Integrität entscheidend ist; sie etablierten ein Maus-Modell mit Maus-Linien mit einer konditionalen Dsc3-null-Mutation und konnten zeigen, dass der Verlust der Dsc3-Funktion in der Epidermis eine beeinträchtigte Zell-Zell-Adhäsion verursachte, welche zu intraepidermaler Blasenbildung führte. Die Läsionen der Dsc3-null-Haut ähnelten histologisch denen, die man bei Patienten mit PV beobachten kann, was nahe legt, dass eine gestörte Funktion des Dsc3, beispielsweise durch Mutation des Dsc3-Gens oder durch Autoantikörper gegen das Dsc3-Protein, eine potentielle Ursache von PV-artigen, blasenbildenden Hauterkrankungen sein könnte (Chen et al., 2008).

Indirekte Evidenz für die Pathogenität von anti-Dsc-Autoantikörpern ist durch den in dieser Arbeit beschriebenen europäischen Patienten mit atypischem Pemphigus gegeben, bei dem, einhergehend mit der Blasenbildung und Akantholyse, IgA-Autoantikörper gegen Dsc nachweisbar waren. Es wäre wünschenswert, in der Zukunft Maus-Modelle unter Verwendung von anti-Dsc-

Antikörpern zu etablieren, um die Pathogenität dieser genauer untersuchen zu können.

#### **4.10 Ausblick**

Obwohl die Bildung von anti-Dsc-Antikörpern auf Patienten mit seltenen Pemphigus-Entitäten beschränkt zu sein scheint, sollte ihre Detektion in noch folgenden Studien kontinuierlich weitergeführt werden. Dadurch wäre es vielleicht möglich, neue Pemphigus-Entitäten zu definieren, die in die bisher bestehende Pemphigus-Klassifikation nicht sicher einzuordnen sind. Neben dem in dieser Arbeit beschriebenen Patienten mit atypischem Pemphigus haben auch andere Arbeitsgruppen Patienten mit atypischen Pemphigus-Erkrankungen mit teilweise bisher einzigartigen Autoantikörper-Profilen beschrieben (Chorzelski et al., 1994; Weston et al., 1998; Dmochowski et al., 1999; Gooptu et al., 1999; Kozłowska et al., 2003; Hisamatsu et al., 2004; Heng et al., 2006; Bolling et al., 2007). Möglicherweise existieren hier bisher noch unbekannte Pemphigus-Formen, die in zukünftigen Studien genauer klassifiziert werden könnten. Unter diesem Aspekt könnte auch genauer erforscht werden, ob bestimmte Autoantikörperprofile in Fällen von Patienten mit atypischem Pemphigus für bestimmte klinische Phänotypen verantwortlich sind. Der ELISA stellt für die Detektion von Autoantikörpern eine sehr praktikable und objektive Untersuchungsmethode dar, die es erlaubt, eine große Anzahl von Seren zur gleichen Zeit mit vergleichbar geringen Aufwand zu untersuchen. Wie oben beschrieben, scheinen jedoch bisher nicht alle relevanten Dsc-Epitope im ELISA exprimiert zu werden, wie beispielsweise bestimmte Dsc1-Epitope, die von IgA-Pemphigus-Seren des SPD-Typs erkannt werden. Hier muss versucht werden, die Expression der Dsc zu optimieren. Für die Detektion von Autoantikörpern in Seren von Patienten mit atypischem Pemphigus scheint der ELISA eine geeignete Screening-Methode zu sein, die in der Zukunft zur Identifizierung von anti-Dsc-Antikörpern breite Anwendung finden sollte.

Zudem sollte weiterhin die Assoziation der Pemphigus-Erkrankung mit inflammatorischen Erkrankungen untersucht werden; auf diese Art und Weise könn-

ten auslösende Faktoren der Pemphigus-Erkrankung möglicherweise identifiziert und gezielt eliminiert werden.

Die Identifizierung neuer Pemphigus-Entitäten und damit verbundener individueller Autoantigene würde möglicherweise eine gezieltere Therapie der einzelnen Erkrankungen möglich machen. Bisher ist nicht klar erwiesen, ob es sich bei anti-Dsc-Antikörpern um pathogene Antikörper handelt. Hier könnte ein Maus-Modell etabliert werden, mit dem die Pathogenität der anti-Dsc-Autoantikörper gezielt untersucht werden könnte. Wäre dies der Fall, würden sich für betroffene Patienten auch ggf. neue Therapieoptionen eröffnen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die gezielte Immunadsorption von Autoantikörpern bei Pemphigus-Patienten eine effektive, sichere und gut tolerierte Therapieoption darstellt (Eming und Hertl, 2006). Eine spezifische Immunadsorption von anti-Dsc-Autoantikörpern wäre ebenfalls eine denkbare Therapieoption und würde möglicherweise die Prognose von bisher noch wenig bekannten, atypischen Pemphigus-Erkrankungen verbessern.

## 5 Zusammenfassung

Bullöse Autoimmundermatosen der Pemphigus-Gruppe sind durch Autoantikörper charakterisiert, die sich gegen desmosomale Adhäsionsproteine richten; zu diesen zählen Desmogleine (Dsg1-4) sowie Desmocolline (Dsc1-3). Es ist bereits bekannt, dass Dsg1 und Dsg3 wichtige Autoantigene des Pemphigus vulgaris (PV) darstellen, welcher die häufigste Form der Pemphigus-Erkrankungen repräsentiert. Über die Rolle der Dsc als Autoantigene der Pemphigus-Erkrankung ist weitaus weniger bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die Prävalenz von anti-Dsc-Autoantikörpern in einem Kollektiv europäischer Pemphigus-Patienten mittels Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) und Western Blot zu erfassen.

Hierfür wurden zunächst rekombinante Dsc1-3-Proteine im Baculovirus-Expressionssystem exprimiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt; mittels dieser rekombinanten Proteine wurde ein ELISA zur Detektion von IgG- und IgA-Autoantikörpern gegen Dsc1-3 an Patientenseren etabliert.

Es wurde eine Kohorte von 82 PV-Patienten, die sich in unterschiedlichen klinischen Stadien (akut, chronisch, in Remission) befanden und verschiedene klinische Phänotypen (mukosal, mukokutan, kutan) aufwiesen, fünf Patienten mit IgA-Pemphigus, drei Patienten mit paraneoplastischem Pemphigus (PNP), zwei Patienten mit atypischen Pemphigus-Erkrankungen, 32 bisher noch nicht genau klassifizierte Patienten, bei denen der Verdacht auf eine Pemphigus-Erkrankung bestand, sowie 22 gesunde Kontrollpersonen mittels ELISA auf das Vorhandensein von anti-Dsc-Autoantikörpern untersucht. Patienten, die im ELISA positiv reagierten, wurden zusätzlich mittels Western Blot auf Autoantikörper gegen Dsc getestet.

Einer der Patienten mit atypischem Pemphigus zeigte eine deutliche IgG- und IgA-Reaktivität gegen Dsc1. Der zweite Patient mit atypischem Pemphigus zeigte eine deutliche IgA-Reaktivität gegen Dsc1 und Dsc3 sowie eine schwache IgA-Reaktivität gegen Dsc2. Ein Patient mit IgA-Pemphigus war IgA-positiv gegen Dsg1, Dsc1 und Dsc2, und ein Patient mit PNP war IgG-positiv gegen Dsc3. Im Gegensatz dazu zeigte keiner der PV-Patienten, unabhängig vom Krankheitsstadium sowie vom klinischen Phänotypen, sowie keiner der Patien-

ten mit Verdacht auf Pemphigus Reaktivität gegen Dsc. Zudem war bei keiner der 22 getesteten gesunden Kontrollpersonen IgG- oder IgA-Reaktivität gegen die rekombinanten Dsc detektierbar.

Demzufolge kann aus dieser Arbeit geschlossen werden, dass Dsc keine häufigen Autoantigene des Pemphigus vulgaris darstellen, aber in seltenen (i.e. IgA-Pemphigus und PNP) sowie atypischen Pemphigus-Erkrankungen als Autoantigene detektiert werden können. Die Generierung von Autoantikörpern gegen Dsc geschieht möglicherweise aufgrund des Prinzips des *Epitope Spreading*. Die Aquirierung von Daten anti-Dsc-positiver Patienten und ihre Charakterisierung wird möglicherweise dazu beitragen, bisher noch unbekannte Pemphigus-Entitäten zu definieren.

Der für diese Arbeit etablierte Dsc-ELISA wird bereits routinemäßig zur Diagnostik von Seren von Patienten mit Pemphigus-Erkrankungen eingesetzt.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Aberer W, Wolff-Schreiner EC, Stingl G, Wolff K: Azathioprine in the treatment of pemphigus vulgaris. A long-term follow up. *J Am Acad Dermatol* 16: 527-533, 1987
2. Ahmed AR, Yunis EJ, Khatri K, Wagner R, Notani G, Awdeh Z, Alper CA: Major histocompatibility complex haplotypes studies in Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7658-7662, 1990
3. Ahmed AR, Wagner R, Khatri K, Notani G, Awdeh Z, Alper CA, Yunis EJ: Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5056-5060, 1991
4. Altmann F, Staudacher E, Wilson IBH, März L: Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconjugate J* 16: 109-123, 1999
5. Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR: Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 67: 869-877, 1991
6. Amagai M, Karpati S, Prussick R, Klaus-Kovtun V, Stanley J: Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J Clin Invest* 90: 919-926, 1992
7. Amagai M, Hashimoto T, Shimizu N, Nishikawa T: Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg 3) produced by baculovirus. *J Clin Invest* 94: 59-67, 1994
8. Amagai M: Adhesion Molecules.I: Keratinocyte-keratinocyte interactions; cadherins and pemphigus. *J Invest Dermatol* 104: 146-152, 1995a

9. Amagai M, Hashimoto T, Green K, Shimizu N, Nishikawa T: Antigen-specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol* 104: 895-901, 1995b
10. Amagai M, Ishii K, Hashimoto T, Gamou S, Shimizu N, Nishikawa T: Conformational epitopes of pemphigus antigens (Dsg1 and Dsg3) are calcium dependent and glycosylation independent. *J Invest Dermatol* 105: 243-247, 1995c
11. Amagai M, Koch P, Nishikawa T, Stanley J: Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. *J Invest Dermatol* 106: 351-355, 1996
12. Amagai M, Nishikawa T, Nousari HC, Anhalt GJ, Hashimoto T: Antibodies against desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) are present in sera from patients with paraneoplastic pemphigus and cause acatholysis in vivo in neonatal mice. *J Clin Invest* 102: 775-782, 1998
13. Amagai M: Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. *J Dermatol Sci* 20: 92-102, 1999a
14. Amagai M, Komai A, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Yamada T, Kitajima Y, Ohya K, Iwanami H, Nishikawa T: Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 140: 351-357, 1999b
15. Amagai M, Tsunoda K, Zillikens D, Nagai T, Nishikawa T: The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J Am Acad Dermatol* 40: 167-170, 1999c
16. Amagai M: Pemphigus as a paradigm of autoimmunity and cell adhesion. *Keio J Med* 51: 133-139, 2002
17. Amagai M, Ahmed AR, Kitajima Y, Bystryn JC, Milner Y, Gniadecki R, Hertl M, Pincelli C, Fridkis-Hareli M, Aoyama Y, Frusic-Zlotkin M, Muller E, David M, Mimouni D, Vind-Kezunovic D, Michel B, Mahoney M, Grando S: Are desmoglein autoantibodies essential for the immunopathogenesis of pemphigus vulgaris, or just "witnesses of disease"? *Exp Dermatol* 15: 815, 2006

18. Anhalt GJ, Kim S.-C., Stanley JR, Korman NJ, Jabs DA, Kory M, Izumi H, Ratrie H, Mutasim D, Ariss-Abdo L, Labib RS: Paraneoplastic pemphigus. An autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. *N Engl J Med* 323: 1729-1735, 1990
19. Anhalt GJ: Paraneoplastic pemphigus. *Adv Dermatol* 12: 77-97, 1997
20. Anhalt GJ: Paraneoplastic pemphigus: the role of tumours and drugs. *Br J Dermatol* 144: 1101-1104, 2001
21. Bazzi H, Getz A, Mahoney MG, Ishida-Yamamoto A, Langbein L, Wahl III JK, Christiano AM: Desmoglein 4 is expressed in highly differentiated keratinocytes and trichocytes in human epidermis and hair follicle. *Differentiation* 74: 129-140, 2006
22. Beutner EH und Jordan RE: Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. *Proc Soc Exp Biol Med* 117: 505-510, 1964
23. Bhol K, Natarajan K, Nagarwalla N, Mohimen A, Aoki V, Ahmed AR: Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenic and nonpathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris: A model for autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5239-5243, 1995
24. Bolling MC, Mekkes JR, Goldschmidt WFM, van Noesel CJM, Jonkman MF, Pas HH: Acquired palmoplantar keratoderma and immunobullous disease associated with antibodies to desmocollin 3. *Br J Dermatol* 157: 168-173, 2007
25. Borradori L, Sonnenberg A: Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol* 112: 411-418, 1999
26. Bowen GM, Peters NT, Fivenson DP, Su LD, Nousari HC, Anhalt GJ, Cooper KD, Stevens SR: Lichenoid dermatitis in paraneoplastic pemphigus. A pathogenic trigger of epitope spreading? *Arch Dermatol* 136: 652-656, 2000
27. Brenner S, Bialy-Golan A, Anhalt GJ: Recognition of pemphigus antigens in drug-induced pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Am Acad Dermatol* 36: 919-923, 1997

28. Caldelari R, de Bruin A, Baumann D, Suter MM, Bierkamp C, Balmer V, Muller E: A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris. *J Cell Biol* 153: 823-834, 2001
29. Campo-Voegeli A, Muniz F, Mascaro J, Casals M, Garcia F, Arimany J, Amagai M, Camps A: Neonatal pemphigus vulgaris with extensive mucocutaneous lesions from a mother with oral pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 147:801-805, 2002
30. Chan LS, Soong HK, Foster CS, Hammerberg C, Cooper KD: Ocular cicatricial pemphigoid occurring as a sequela of Stevens-Johnson syndrome. *JAMA* 266: 1543-1546, 1991
31. Chan L, Vanderlugt C, Hashimoto T, Nishikawa T, Zone J, Black M, Wojnarowska F, Stevens S, Chen M, Fairley J, Woodley D, Miller S, Gordon K: Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases. *J Invest Dermatol* 110: 103-109, 1998
32. Chen J, Den Z, Koch PJ: Loss of desmocollin 3 in mice leads to epidermal blistering. *J Cell Sci* 121: 2844-2849, 2008
33. Cheng X, Mihindukulasuriya K, Den Z, Kowalczyk AP, Calkins CC, Ishiko A, Shimizu A, Koch PJ: Assessment of splice variant-specific functions of desmocollin 1 in the skin. *Mol Cell Biol* 24: 154-163, 2004
34. Chorzelski TP, Hashimoto T, Nishikawa T, Ebihara T, Dmochowski M, Ismail M, Jablonska S: Unusual acantholytic bullous dermatosis associated with neoplasia and IgG and IgA antibodies against bovine desmocollins I and II. *J Am Acad Dermatol* 31: 351-355, 1994
35. Chowdhury M und Natarajan S: Neonatal pemphigus vulgaris associated with mild oral pemphigus vulgaris in the mother during pregnancy. *Br J Dermatol* 139: 500-503, 1998
36. Coelho S, Reis JP, Tellechea O, Figueiredo A, Black M: Paraneoplastic pemphigus with clinical features of lichen planus associated with low-grade B cell lymphoma. *Int J Dermatol* 44: 366-371, 2005

37. Cozzani E, Dal Bello MG, Mastrogioiaco A, Drosera M, Parodi A: Antidesmoplakin antibodies in pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 154: 624-628, 2006
38. de Oliveira JP, Gabbi TV, Hashimoto T, Aoki V, Santi CG, Maruta CW, Rivitti EA, Reis VM: Two Brazilian cases of IgA pemphigus. *J Dermatol* 30: 886-891, 2003
39. Ding X, Aoki V, Mascaro Jr J, Lopez-Swidorski A, Diaz L, Fairley J: Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. *J Invest Dermatol* 109: 592-596, 1997
40. Ding X, Diaz L, Fairley J, Giudice G, Liu Z: The anti-desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris sera are pathogenic. *J Invest Dermatol* 112: 739-743, 1999
41. Dmochowski M, Hashimoto T, Garrod DR, Nishikawa T: Desmocollins I and II are recognized by certain sera from patients with various types of pemphigus, particularly brazilian pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol* 100: 380-384, 1993
42. Dmochowski M, Hashimoto T, Chidgey M, Yue K, Wilkinson R, Nishikawa T, Garrod D: Demonstration of antibodies to bovine desmocollin isoforms in certain pemphigus sera. *Br J Dermatol* 133: 519-525, 1995
43. Dmochowski M, Nie Z, Kiyokawa C, Hashimoto T: Human desmocollin 1a transiently expressed in COS-7 cells and NIH 3T3-3 cells is reacted by IgG4 antibodies in a pemphigus foliaceus serum. *J Dermatol Sci* 21: 42-48, 1999
44. Ebihara T, Hashimoto T, Iwatsuki K, Takigawa M, Ando M, Ohkawara A, Nishikawa T: Autoantigens for IgA anti-intercellular antibodies of intercellular IgA vesiculopustular dermatosis. *J Invest Dermatol* 97: 742-745, 1991
45. Emery D, Diaz L, Fairley J, Lopez A, Taylor A, Giudice G: Pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris autoantibodies react with the extracellular domain of desmoglein-1. *J Invest Dermatol* 104: 323-328, 1995

46. Eming und Hertl: Immunoabsorption in pemphigus. *Autoimmunity* 39: 609-616, 2006
47. Eming R, Rech J, Barth S, Kalden J, Schuler G, Harrer T, Hertl M: Prolonged clinical remission of patients with severe pemphigus upon rapid removal of desmoglein-reactive autoantibodies by immunoabsorption. *Dermatology* 212: 177-187, 2006
48. Eming R, Nagel A, Wolff-Franke S, Podstawa E, Debus D, Hertl M: Rituximab exerts a dual effect in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 128: 2850-8, 2008
49. Enk AH, Knop J: Mycophenolate is effective in the treatment of pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol* 135: 54-56, 1999
50. Esaki C, Seishima M, Yamada T, Osada K, Kitajima Y: Pharmacologic evidence for involvement of phospholipase C in pemphigus IgG-induced inositol 1,4,5-triphosphate generation, intracellular calcium increase, and plasminogen activator secretion in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. *J Invest Dermatol* 105: 329-333, 1995
51. Feliciani C, Toto P, Amerio P, Pour SM, Coscione G, Shivji G, Wang B, Sauder D: In vitro and in vivo expression of interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha mRNA in pemphigus vulgaris: interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha are involved in acantholysis. *J Invest Dermatol* 114: 71-77, 2000
52. Fleischli M, Valek R, Pandya A: Pulse intravenous cyclophosphamide therapy in pemphigus. *Arch Dermatol* 135: 57-61, 1999
53. Fried R, Lynfield Y, Vitale P, Anhalt G: Paraneoplastic pemphigus appearing as bullous pemphigoid-like eruption after palliative radiation therapy. *J Am Acad Dermatol* 29: 815-817, 1993
54. Friedman H, Campbell I, Rocha-Alvarez R, Ferrari I, Coimbra C, Moraes J, Flowers N, Stastny P, Fernandez-Vina M, Olague-Alcala M, Diaz L: Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in Native Americans from Brazil. *J Am Acad Dermatol* 32: 949-956, 1995
55. Fullerton SH, Woodley DT, Smoller BR, Anhalt GJ: Paraneoplastic pemphigus with autoantibody deposition in bronchial epithelium after

- autologous bone marrow transplantation. *JAMA* 267: 1500-1502, 1992
56. Garrod D, Chidgey M, North A: Desmosomes: differentiation, development, dynamics and disease. *Curr Opin Cell Biol* 8: 670-678, 1996
  57. Gooptu C, Mendelsohn S, Amagai M, Hashimoto T, Nishikawa T, Wojnarowska F: Unique immunobullous disease in a child with predominantly IgA response to three desmosomal proteins. *Br J Dermatol* 141: 882-886, 1999
  58. Gooptu C, Littlewood TJ, Frith P, Lyon CC, Carmichael AJ, Oliwiecki S, MacWhannel A, Amagai M, Hashimoto T, Dean D, Allen J, Wojnarowska F: Paraneoplastic pemphigus: an association with fludara-bine? *Br J Dermatol* 144: 1255-1261, 2001
  59. Green K, Jones J: Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB J.* 10: 871-881, 1996
  60. Harman KE, Holmes G, Bhogal BS, McFadden J, Black MM: Inter-cellular IgA dermatosis (IgA pemphigus) – two cases illustrating the clinical heterogeneity of this disorder. *Clin Exp Dermatol* 24, 464-466, 1999
  61. Harman K, Gratian M, Seed P, Bhogal B, Challacombe S, Black M: Diagnosis of pemphigus by ELISA: a critical evaluation of two ELISAs for the detection of antibodies to the major pemphigus antigens, desmoglein 1 and 3. *Clin Exp Dermatol* 25: 236-240, 2000
  62. Harman K, Seed P, Gratian M, Bhogal B, Challacombe S, Black M: The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and desmoglein 3 antibody levels. *Br J Dermatol* 144: 775-780, 2001
  63. Hashimoto K, Hashimoto T, Higashiyama M, Nishikawa T, Garrod DR, Yoshikawa K: Detection of anti-desmocollin I and II autoantibodies in two cases of Hallopeau type pemphigus vegetans by immunoblot analysis. *J Dermatol Sci* 7: 100-106, 1994
  64. Hashimoto T, Ogawa M, Konohama A, Nishikawa T: Detection of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antigens by immunoblot

- analysis using different antigen sources. *J Invest Dermatol* 94: 327-331, 1990
65. Hashimoto T, Amagai M, Watanabe K, Chorzelski TP, Bhogal BS, Black MM, Stevens HP, Boorsma DM, Korman NJ, Gamou S, Shimizu N, Nishikawa T: Characterization of paraneoplastic pemphigus autoantigens by immunoblot analysis. *J Invest Dermatol* 104: 829-834, 1995a
  66. Hashimoto T, Amagai M, Watanabe K, Dmochowski M, Chidgey M, Yue K, Garrod D, Nishikawa T: A case of pemphigus vulgaris showing reactivity with pemphigus antigens (Dsg 1 and Dsg 3) and desmocollins. *J Invest Dermatol* 104: 541-544, 1995b
  67. Hashimoto T, Ebihara T, Dmochowski M, Kawamura K, Suzuki T, Tsurufuji S, Garrod DR, Nishikawa T: IgA antikeratinocyte surface autoantibodies from two types of intercellular IgA vesiculopustular dermatosis recognize distinct isoforms of desmocollin. *Arch Dermatol Res* 288: 447-452, 1996
  68. Hashimoto T, Kiyokawa C, Mori O, Miyasato M, Chidgey M, Garrod D, Kobayashi Y, Komori K, Ishii K, Amagai M, Nishikawa T: Human desmocollin 1 (Dsc1) is an autoantigen for the subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus. *J Invest Dermatol* 109: 127-131, 1997
  69. Hashimoto T, Komai A, Futei Y, Nishikawa T, Amagai M: Detection of IgA autoantibodies to desmogleins by enzyme-linked immunosorbent assay. *Arch Dermatol* 137: 735-738, 2001
  70. Hashimoto T, Yasumoto S, Nagata Y, Okamoto T, Fujita S: Clinical, histopathological and immunological distinction in two cases of IgA pemphigus. *Clin Exp Dermatol* 27: 636-640, 2002
  71. Hashimoto T: Recent advances in the study of the pathophysiology of pemphigus. *Arch Dermatol Res* 295 Suppl 1: S2-S11, 2003
  72. Heng A, Nwaneshiudu A, Hashimoto T, Amagai M, Stanley JR: Intra-epidermal neutrophilic IgA/IgG antidesmocollin 1 pemphigus. *Br J Dermatol* 154: 1018-1020, 2006

73. Hertl M, Amagai M, Sundaram H, Stanley J, Ishii K, Katz S: Recognition of desmoglein 3 by autoreactive T cells in pemphigus vulgaris patients and normals. *J Invest Dermatol* 110: 62-66, 1998a
74. Hertl M, Karr R, Amagai M, Katz S: Heterogeneous MHC II restriction pattern of autoreactive desmoglein 3 specific T cell responses in pemphigus vulgaris patients and normals. *J Invest Dermatol* 110: 388-392, 1998b
75. Hertl M: Humoral and cellular autoimmunity in autoimmune bullous skin disorders. *Int Arch Allergy Immunol* 122: 91-100, 2000
76. Hertl M: Autoimmune diseases of the skin. Pathogenesis, diagnosis, management. Second Edition. Springer, Wien. 2001
77. Hertl M, Schuler G: Bullous autoimmune dermatoses. 1: Classification. *Hautarzt* 53: 207-221, 2002a
78. Hertl M, Schuler G: Bullous autoimmune dermatoses. 2: Pathogenesis. *Hautarzt* 53: 277-285, 2002b
79. Hertl M, Schuler G: Bullous autoimmune dermatoses. 3: Diagnosis and therapy. *Hautarzt* 53: 352-366, 2002c
80. Hertl M, Eming R, Borradori L: Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) – ultimate or first choice in pemphigus? *Dermatology* 214: 275-277, 2007
81. Hisamatsu Y, Amagai M, Garrod DR, Kanzaki T, Hashimoto T: The detection of IgG and IgA autoantibodies to desmocollins 1-3 by enzyme-linked immunosorbent assays using baculovirus-expressed proteins, in atypical pemphigus but not in typical pemphigus. *Br J Dermatol* 151: 73-83, 2004
82. Hof H, Dörries R: Medizinische Mikrobiologie. Thieme, Stuttgart. 2005
83. Huber O: Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease. *Cell Mol Life Sci* 60: 1872-1890, 2003

84. Huilgol SC, Black MM: Management of the immunobullous disorders. II. Pemphigus. *Clin Exp Dermatol* 20: 283-293, 1995
85. Ishii K, Amagai M, Hall R, Hashimoto T, Takayanagi A, Gamou S, Shimizu N, Nishikawa T: Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *J Immunol* 159: 2010-2017, 1997
86. Ishii N, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto T: Immunolocalization of target autoantigens in IgA pemphigus. *Clin Exp Dermatol* 29: 62-66, 2004
87. Jacobi A, Schuler G, Hertl M: Rapid control of therapy-refractory pemphigus vulgaris by treatment with the tumour necrosis factor-alpha inhibitor infliximab. *Br J Dermatol* 153: 448-449, 2005
88. James JA, Gross T, Scofield RH, Harley JB: Immunoglobulin epitope spreading and autoimmune disease after peptide immunization: Sm B/B'-derived PPPGMRPP and PPPGIRGP induce splicesome autoimmunity. *J Exp Med* 181: 453-461, 1995
89. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: *Immunologie*. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer, Heidelberg. 2002
90. Jolles S: A review of high-dose intravenous immunoglobuline (hdIVIg) in the treatment of autoimmune blistering disorders. *Clin Exp Dermatol* 26: 127-131, 2001
91. Jung E und Moll I: *Dermatologie*. 5. Auflage. Thieme, Stuttgart. 2003
92. Kaplan I, Hodak E, Ackerman L, Mimouni D, Anhalt GJ, Calderon S: Neoplasms associated with paraneoplastic pemphigus: a review with emphasis on non-hematologic malignancy and oral mucosal manifestations. *Oral Oncology* 40: 553-562, 2004
93. Karpati S, Amagai M, Prussick R, Cehrs K, Stanley J: Pemphigus vulgaris antigen, a desmoglein type of cadherin, is localized within keratinocyte desmosomes. *J Cell Biol* 122: 409-415, 1993

94. Karpati S, Amagai M, Liu WL, Dmochowski M, Hashimoto T, Horvath A: Identification of desmoglein 1 as an autoantigen in a patient with intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis type of IgA pemphigus. *Exp Dermatol* 9: 224-228, 2000
95. Kim S.-C., Won JH, Chung J, Bang DS: IgA pemphigus: Report of a case with immunoelectron localization of bound IgA in the skin. *J Am Acad Dermatol* 34: 852-854, 1996
96. Kitajima Y, Aoyama Y, Seishima M: Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell detachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: Involvement of protein kinase C. *J Invest Dermatol Symp Proc* 4: 137-144, 1999
97. Kiyokawa C, Ruhrberg C, Nie Z, Karashima T, Mori O, Nishikawa T, Green K, Anhalt G, DiColandrea T, Watt F, Hashimoto T: Envoplakin and periplakin are components of the paraneoplastic pemphigus antigen complex. *J Invest Dermatol* 111: 1236-1238, 1998
98. Kopp T, Sitaru C, Pieczkowski F, Schneeberger A, Födinger D, Zillikens D, Stingl G, Karhofer F: IgA-pemphigus – occurrence of anti-desmocollin 1 and anti-desmoglein 1 antibody reactivity in an individual patient. *J Dtsch Dermatol Ges* 4: 1045-50, 2006
99. Kozłowska A, Hashimoto T, Jarzabek-Chorzelska M, Amagai A, Nagata Y, Strasz Z, Jabłonska S: Pemphigus herpetiformis with IgA and IgG antibodies to desmoglein 1 and IgG antibodies to desmocollin 3. *J Am Acad Dermatol* 48: 117-122, 2003
100. Kuroda K, Veit M, Klenk HD: Retarded processing of influenza virus hemagglutinin in insect cells. *Virology* 180: 159-165, 1991
101. Li N, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti E, Diaz L: The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Exp Med* 197: 1501-1510, 2003
102. Lin MS, Swartz SJ, Lopez A, Ding X, Fernandez-Vina M, Stastny P, Fairley J, Diaz LA: Development and characterization of desmoglein-3

- specific T cells from patients with pemphigus vulgaris. *J Clin Invest* 99: 31-40, 1997
103. Liu AY, Valenzuela R, Helm TN, Camisa C, Melton AL, Bergfeld WF: Indirect immunofluorescence on rat bladder transitional epithelium: A test with high specificity for paraneoplastic pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 28, 696-699, 1993
  104. Lüllmann-Rauch R: *Histologie*. Thieme, Stuttgart. 2003
  105. Male D: *Immunologie auf einen Blick*. Urban und Fischer, München. 2005
  106. Marzano A, Grammatica A, Cozzani E, Terracina M, Berti E: Paraneoplastic pemphigus. A report of two cases associated with chronic B-cell lymphocytic leukaemia. *Br J Dermatol* 145: 127-131, 2001
  107. Matsuo K, Komai A, Ishii K, Futei Y, Amagai M, Deguchi H, Danno K, Hashimoto T: Pemphigus foliaceus with prominent neutrophilic pustules. *Br J Dermatol* 145: 132-136, 2001
  108. McRae BI, Vanderlugt CL, Dal Canto MC, Miller SD: Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of the experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 182: 75-85, 1995
  109. Memar O, Rajaraman S, Thotakura R, Tying S, Fan J.-L., Seetharamaiah G, Lopez A, Jordon R, Prabhakar B: Recombinant desmoglein 3 has the necessary epitopes to adsorb and induce blister-causing antibodies. *J Invest Dermatol* 106: 261-268, 1996
  110. Miyagawa S, Amagai M, Iida T, Yamamoto Y, Nishikawa T, Shirai T: Late development of antidesmoglein 1 antibodies in pemphigus vulgaris: correlation with disease progression. *Br J Dermatol* 141: 1084-1087, 1999
  111. Moll R, Moll I: Epidermal adhesion molecules and basement membrane components as target structures of autoimmunity. *Virchows Arch* 432: 487-504, 1998
  112. Müller R, Svoboda V, Wenzel E, Gebert S, Hunzelmann N, Müller H-H, Hertl M: IgG reactivity against non-conformational NH<sub>2</sub>-terminal

- epitopes of the desmoglein 3 ectodomain relates to clinical activity and phenotype of pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol* 15: 606-614, 2006
113. Müller R, Svoboda V, Wenzel E, Müller HH, Hertl M: IgG against extracellular subdomains of desmoglein 3 relates to clinical phenotype of pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol* 17: 35-43, 2008
  114. Müller R, Heber B, Hashimoto T, Messer G, Müllegger R, Niedermeier A, Hertl M: Autoantibodies against desmocollins in European patients with pemphigus. *Clin Exp Dermatol* 2009, in press
  115. Niedermeier A, Eming R, Pfütze M, Neumann C, Happel C, Reich K, Hertl M: Clinical response of severe mechanobullous epidermolysis bullosa acquisita to combined treatment with immunoadsorption and rituximab (anti-CD20 monoclonal antibodies). *Arch Dermatol* 143: 1-7, 2007
  116. Nousari HC, Deterding R, Wojtczack H, Aho S, Uitto J, Hashimoto T, Anhalt GJ: Brief report: The mechanism of respiratory failure in paraneoplastic pemphigus. *N Engl J Med* 340: 1406-1410, 1999
  117. Nguyen VT, Ndoye A, Grando SA: Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin: a novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. *J Biol Chem* 275: 29466-29476, 2000a
  118. Nguyen VT, Ndoye A, Grando SA: Novel human  $\alpha 9$  acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by pemphigus vulgaris autoimmunity. *Am J Pathol* 157: 1377-139, 2000b
  119. Nguyen VT, Ndoye A, Shultz LD, Pittelkow MR, Grando SA: Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris-like lesions. *J Clin Invest* 106: 1467-1479, 2000c
  120. Oursler JR, Labib RS, Ariss-Abdo L, Burke T, O'Keefe EJ, Anhalt GJ: Human autoantibodies against desmoplakins in paraneoplastic pemphigus. *J Clin Invest* 89: 1775-1782, 1992

121. Palomares LA, Joosten CE, Hughes PR, Granados RR, Shuler ML: Novel insect cell line capable of complex *N*-glycosylation and sialylation of recombinant proteins. *Biotechnol Prog* 19: 185-192, 2003
122. Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester G-R: *Taschenatlas der Immunologie. Grundlagen-Labor-Klinik.* Thieme, Stuttgart. 2007
123. BD Biosciences: *Baculovirus Expression Vector System Manual.* 6th Edition. Heidelberg. 1999
124. Plötz SG, Abeck D, Behrendt H, Simon HU, Ring J: Eosinophilic cellulitis (Wells syndrome). *Hautarzt* 51: 182-186, 2000
125. Preisz K, Horvath A, Sardy M, Somlai B, Harsing J, Amagai M, Hashimoto T, Nagata Y, Fekete S, Karpati S: Exacerbation of paraneoplastic pemphigus by cyclophosphamide treatment: detection of novel autoantigens and bronchial autoantibodies. *Br J Dermatol* 150: 1018-1024, 2004
126. Proby C, Fujii Y, Owaribe K, Nishikawa T, Amagai M: Human autoantibodies against HD1/Plectin in paraneoplastic pemphigus. *J Invest Dermatol* 112: 153-156, 1999
127. Prost C, Intrator L, Wechsler J: IgA autoantibodies bind to pemphigus vulgaris antigen in a case of intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis. *J Am Acad Dermatol* 25: 846-848, 1991
128. Robinson N, Hashimoto T, Amagai M, Lawrence S: The new pemphigus variants. *J Am Acad Dermatol* 40: 649-71, 1999
129. Salato VK, Hacker-Foegen MK, Lazarova Z, Fairley JA, Lin MS: Role of intramolecular epitope spreading in pemphigus vulgaris. *Clin Immunol* 116: 54-64, 2005
130. Santi C, Maruta C, Aoki V, Sotto M, Rivitti E, Diaz L and the Cooperative Group on Fogo Selvagem Research Sao Paulo, Brazil and Milwaukee, Wisconsin: Pemphigus herpetiformis is a rare clinical expression of nonendemic pemphigus foliaceus, fogo selvagem, and pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 34: 40-46, 1996

131. Schäfer S, Koch PJ, Franke WW: Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res* 211: 391-399, 1994
132. Schaefer BM, Jaeger CJ, Kramer MD: Plasminogen activator system in pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 135: 726-732, 1996
133. Schiebler T, Schmidt W: *Anatomie*. 8. Auflage. Springer, Berlin. 2002
134. Schmidt E, Bröcker E-B, Zillikens D: Pemphigus: Loss of desmosomal cell-cell adhesion. *Hautarzt* 51: 309-318, 2000
135. Seishima M, Esaki C, Osada K, Mori S, Hashimoto T, Kitajima Y: Pemphigus IgG, but not bullous pemphigoid IgG, causes a transient increase in intracellular calcium and inositol 1,4,5-triphosphate in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. *J Invest Dermatol* 104: 33-37; 1995
136. Setterfield J, Bhogal B, Black MM, McGibbon DH: Dermatitis herpetiformis and bullous pemphigoid: a developing association confirmed by immunoelectronmicroscopy. *Br J Dermatol* 136: 253-256, 1997
137. Shah N, Green A, Elgart G, Kerdel F: The use of chlorambucil with prednisone in the treatment of pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 42: 85-88, 2000
138. Sharma P, Mao X, Payne AS: Beyond steric hindrance: the role of adhesion signaling pathways in the pathogenesis of pemphigus. *J Dermatol Sci* 48: 1-14, 2007
139. Shimomura Y, Sakamoto F, Kariya N, Matsunaga K, Ito M: Mutations in the desmoglein 4 gene are associated with monilethrix-like congenital hypotrichosis. *J Invest Dermatol* 126: 1281-5, 2006
140. Sinha AA, Brautbar C, Szafer F, Friedmann A, Tzfonl E, Todd JA, Steinman L, McDevitt HO: A newly characterized HLA DQ beta allele associated with pemphigus vulgaris. *Science* 239: 1026-1029, 1988
141. Söhnlein P, Müller M, Syren K, Hatmann U, Böhm BO, Meinck HM, Knip M, Akerbom HK: Epitope spreading and varying but not disease-

- specific GAD65 antibody response in Type I diabetes. *Diabetologica* 43: 210-217, 2000
142. Spaeth S, Riechers R, Borradori L, Zillikens D, Büdinger L, Hertl M: IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of desmoglein 3 in active pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 144, 1183-1188, 2001
  143. Spindler V, Drenckhahn D, Zillikens D, Waschke J: Pemphigus IgG causes skin splitting in the presence of both desmoglein 1 and desmoglein 3. *Am J Pathol* 171: 906-916, 2007
  144. Supapannachart N, Mutasim D: The distribution of IgA pemphigus antigen in human skin and the role of IgA anti-cell surface antibodies in the induction of intraepidermal acantholysis. *Arch Dermatol* 129: 605-608, 1993
  145. Tchernev G, Orfanos CE: Antigen mimicry, epitope spreading and the pathogenesis of pemphigus. *Tissue Antigens* 68: 280-6, 2006
  146. Tilakaratne WM, Dissanayake M: Paraneoplastic pemphigus: a case report and review of literature. *Oral Diseases* 11, 326-329, 2005
  147. Toth GG, Jonkman MF: Therapie of pemphigus. *Clin Dermatol* 19: 761-767, 2001
  148. Udey M, Stanley J: Pemphigus – diseases of antidesmosomal autoimmunity. *JAMA* 282: 572-6, 1999
  149. Vanderlugt CJ und Miller SD: Epitope spreading. *Curr Opin Immunol* 8: 831-836, 1996
  150. Veldman C, Stauber A, Wassmuth R, Uter W, Schuler G, Hertl M: Dichotomy of autoreactive Th1 and Th2 cell responses to desmoglein 3 in patients with pemphigus vulgaris (PV) and healthy carriers of PV-associated HLA class II alleles. *J Immunol* 170: 635-642, 2003
  151. Veldman CM, Gebhard K, Uter W, Wassmuth R, Grötzinger J, Schultz E, Hertl M: T cell recognition of desmoglein 3 peptides in patients with pemphigus vulgaris and healthy individuals. *J Immunol* 172: 3883-3892, 2004a

152. Veldman C, Höhne A, Dieckmann D, Schuler G, Hertl M: Type I regulatory T cells specific for desmoglein 3 are more frequently detected in healthy individuals than in patients with pemphigus vulgaris. *J Immunol* 172: 6468-6475, 2004b
153. Wallach D: Intraepidermal IgA pustulosis. *J Am Acad Dermatol* 27: 993-1000, 1992
154. Wang J, Kwon J, Ding X, Fairley JA, Woodley DT, Chan LS: Nonsecretory IgA1 autoantibodies targeting desmosomal component desmoglein 3 in intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis. *Am J Pathol* 150: 1901-1907, 1997
155. Wang X, Brégégère F, Frušić-Zlotkin M, Feinmesser M, Michel B, Milner Y: Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunglobulins. *Apoptosis* 9: 131-143, 2004
156. Waschke J: The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol* 130: 21-54, 2008
157. Weston WL, Friednash M, Hashimoto T, Seline P, Huff JC, Morelli JG: A novel childhood pemphigus vegetans variant of intraepidermal neutrophilic IgA dermatosis. *J Am Acad Dermatol* 38: 635-8, 1998
158. Windoffer R, Borchert-Stuhlträger M, Leube R: Desmosomes: interconnected calcium-dependent structures of remarkable stability with significant integral membrane protein turnover. *J Cell Sci* 115: 1717-1732, 2002
159. Wucherpfennig KW, Yu B, Bhol K, Monos DS, Argyris E, Karr RW, Ahmed AR, Strominger JL: Structural basis for major histocompatibility complex (MHC)-linked susceptibility to autoimmunity: Charged residues of a single MHC binding pocket confer selective presentation of self-peptides in pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11935-11939, 1995
160. Yasuda H, Kobayashi H, Hashimoto T, Itoh K, Yamane M, Nakamura J: Subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus: demonstra-

tion of autoantibodies to desmocollin-1 and clinical review. Br J Dermatol 143: 144-148, 2000

## 7 Anhang

### 7.1 IgG-Reaktivitäten der PV-Patienten gegen Dsg3 und Dsc1-3 im ELISA

PV-Patient	Stadium	Phänotyp	anti-Dsg3-IgG	anti-Dsc1-IgG	anti-Dsc2-IgG	anti-Dsc3-IgG
P254	a	m	1,245	0,274	0,2845	0,2505
P261	a	m	1,1915	0,327	0,348	0,302
P1305	a	m	0,468	0,251	0,2905	0,27
P1698	a	m	0,6965	0,252	0,2795	0,268
AC115	a	mc	0,9065	0,231	0,2555	0,2285
P83	a	mc	0,832	0,2685	0,3415	0,2835
P206	a	mc	0,6475	0,221	0,274	0,261
P207	a	mc	0,9865	0,18	0,199	0,2835
P236	a	mc	1,109	0,224	0,2555	0,2365
P238	a	mc	1,1435	0,268	0,311	0,282
P239	a	mc	0,807	0,2695	0,282	0,2915
P250	a	mc	0,553	0,2165	0,3075	0,309
P260	a	mc	1,034	0,2325	0,224	0,218
P326	a	mc	1,0015	0,191	0,3165	0,2215
P441	a	mc	1,354	0,1915	0,263	0,23
P452	a	mc	2,6185	0,186	0,242	0,237
P489	a	mc	1,4045	0,211	0,281	0,2615
P700	a	mc	0,534	0,202	0,2295	0,185
P1053	a	mc	0,5235	0,296	0,3405	0,2755
P1092	a	mc	1,3	0,204	0,2635	0,193
P1248	a	mc	0,7955	0,3715	0,2765	0,2285
P1699	a	mc	0,943	0,2715	0,2905	0,3125
P1721	a	mc	0,7045	0,1915	0,215	0,176
P1729	a	mc	0,9025	0,1745	0,1755	0,151
P1740	a	mc	1,261	0,2295	0,2515	0,2045
P35	a	c	0,8385	0,2055	0,222	0,187
P246	a	c	0,442	0,209	0,268	0,1795
P75	c	m	0,631	0,229	0,2055	0,211
P138	c	m	0,428	0,314	0,2705	0,2215
P192	c	m	1,3955	0,22	0,2455	0,2025
P193	c	m	0,566	0,174	0,194	0,211
P197	c	m	0,754	0,2055	0,23	0,198
P202	c	m	0,696	0,2235	0,358	0,2065
P203	c	m	0,979	0,198	0,1995	0,202
P234	c	m	0,8155	0,222	0,219	0,214
P823	c	m	1,017	0,3185	0,338	0,3475
P1149	c	m	0,784	0,195	0,203	0,185
P55	c	mc	1,1175	0,1915	0,243	0,202
P87	c	mc	0,79	0,2545	0,2465	0,229
P92	c	mc	0,7665	0,175	0,1925	0,1645
P184	c	mc	0,424	0,323	0,278	0,2865
P187	c	mc	0,5605	0,2775	0,2955	0,299
P191	c	mc	0,8295	0,309	0,3615	0,3195

P194	c	mc	0,8835	0,3295	0,3735	0,3475
P196	c	mc	0,7525	0,193	0,1975	0,2115
P201	c	mc	1,074	0,312	0,355	0,3405
P235	c	mc	0,749	0,243	0,294	0,26
P237	c	mc	0,927	0,2935	0,336	0,2985
P241	c	mc	0,857	0,1705	0,2215	0,201
P247	c	mc	0,844	0,271	0,22	0,247
P251	c	mc	1,302	0,2885	0,3	0,2715
P332	c	mc	0,8795	0,197	0,1895	0,1795
P474	c	mc	1,024	0,246	0,317	0,2545
P492	c	mc	1,0055	0,1835	0,17	0,16
P525	c	mc	0,947	0,202	0,1705	0,1545
P605	c	mc	0,4925	0,1905	0,292	0,3465
P615	c	mc	0,788	0,271	0,281	0,262
P646	c	mc	0,5555	0,3465	0,3555	0,359
P717	c	mc	0,655	0,3325	0,3665	0,3405
P893	c	mc	0,4285	0,2045	0,235	0,2575
P980	c	mc	0,451	0,202	0,218	0,193
P999	c	mc	1,106	0,2325	0,2435	0,219
P1048	c	mc	0,886	0,1905	0,2355	0,2365
P1426	c	mc	0,6855	0,224	0,2255	0,19
P93	c	c	0,416	0,2115	0,277	0,2735
P104	c	c	0,9705	0,1685	0,2185	0,237
P204	c	c	0,982	0,233	0,2845	0,266
P338	c	c	0,4175	0,244	0,269	0,326
P123	r	m	0,2715	0,169	0,169	0,152
P205	r	m	0,198	0,2415	0,3425	0,271
P1413	r	m	0,4325	0,1875	0,228	0,2105
P12	r	mc	0,2255	0,164	0,1705	0,1525
P43	r	mc	0,5025	0,278	0,283	0,195
P70	r	mc	0,221	0,2665	0,3475	0,3105
P96	r	mc	0,248	0,2945	0,3625	0,3355
P133	r	mc	0,8255	0,204	0,2545	0,2385
P244	r	mc	0,321	0,241	0,3495	0,239
P256	r	mc	0,8865	0,1985	0,2805	0,2005
P259	r	mc	0,1645	0,2005	0,2465	0,217
P644	r	mc	0,1795	0,226	0,2775	0,268
P709	r	mc	0,8625	0,2375	0,2345	0,2185
P44	r	c	0,6515	0,2235	0,235	0,2245

## 7.2 IgG- und IgA-Reaktivitäten der IgA-Pemphigus-Seren gegen Dsg3, Dsg1 und Dsc1-3 im ELISA

### 7.2.1 IgG-Reaktivitäten der IgA-Pemphigus-Seren

IgA-P.-Patient	anti-Dsg3-IgG	anti-Dsg1-IgG	anti-Dsc1-IgG	anti-Dsc2-IgG	anti-Dsc3-IgG
M5993	0,3000		0,3305	0,3090	0,3285
M5708	0,335		0,3475	0,3155	0,344
P2622	0,244	0,2180	0,319	0,2785	0,2685
P2299	0,2945	0,2045	0,2535	0,2425	0,307
3301	0,206	0,215	0,2165	0,198	0,2475

### 7.2.2 IgA-Reaktivitäten der IgA-Pemphigus-Seren

IgA-P.-Patient	anti-Dsg3-IgA	anti-Dsg1-IgA	anti-Dsc1-IgA	anti-Dsc2-IgA	anti-Dsc3-IgA
M5993	0,2245		0,2380	0,2705	0,2915
M5708	0,2575		0,2645	0,2455	0,2890
P2622	0,332	0,3015	0,1985	0,197	0,2545
P2299	0,2415	0,2205	0,171	0,2235	0,231
3301	0,321	0,739	1,2555	1,193	0,297

## 7.3 IgG- und IgA-Reaktivitäten der PNP-Seren gegen Dsg3 und Dsc1-3 im ELISA

### 7.3.1 IgG-Reaktivitäten der PNP-Seren

PNP-Patient	anti-Dsg3-IgG	anti-Dsc1-IgG	anti-Dsc2-IgG	anti-Dsc3-IgG
P2120	0,953	0,245	0,2605	0,5265
P2119	0,4105	0,3115	0,3465	0,287
P2118	0,4	0,206	0,367	0,257

### 7.3.2 IgA-Reaktivitäten der PNP-Seren

PNP-Patient	anti-Dsg3-IgA	anti-Dsc1-IgA	anti-Dsc2-IgA	anti-Dsc3-IgA
P2120	0,192	0,169	0,1885	0,1785
P2119	0,1695	0,158	0,1635	0,1745
P2118	0,1425	0,1455	0,1790	0,1890

## 7.4 IgG- und IgA-Reaktivitäten der Patienten mit atypischem Pemphigus gegen Dsg3 und Dsc1-3 im ELISA

### 7.4.1 IgG-Reaktivitäten der Patienten mit atypischem Pemphigus

atyp. Patient	anti-Dsg3-IgG	anti-Dsc1-IgG	anti-Dsc2-IgG	anti-Dsc3-IgG
P2298(#1)	0,2	1,072	0,238	0,3095
P2328(#2,Serum1)	0,25125	0,25625	0,246	0,244
P2708(#2,Serum2)	0,3035	0,27525	0,26625	0,27125

### 7.4.2 IgA-Reaktivitäten der Patienten mit atypischem Pemphigus

atyp. Patient	anti-Dsg3-IgA	anti-Dsc1-IgA	anti-Dsc2-IgA	anti-Dsc3-IgA
P2298(#1)	0,206	0,548	0,2715	0,26
P2328(#2,Serum1)	0,3190	0,3440	0,3105	0,3000
P2708(#2,Serum2)	0,3960	0,4125	0,4320	0,5185

## 7.5 IgG- und IgA-Reaktivitäten der Patienten mit Verdacht auf Pemphigus gegen Dsg3 und Dsc1-3 im ELISA

### 7.5.1 IgG-Reaktivitäten der Patienten mit Verdacht auf Pemphigus

Patient	anti-Dsg3-IgG	anti-Dsc1-IgG	anti-Dsc2-IgG	anti-Dsc3-IgG
P1920	0,147	0,1925	0,263	0,2225
P1805	0,181	0,2335	0,346	0,2985
P1601	0,126	0,148	0,2015	0,174
P489	1,4045	0,211	0,281	0,2615
P22	0,169	0,1785	0,2325	0,224
P 50	0,1945	0,2155	0,2785	0,2545
P1911	0,1945	0,231	0,307	0,2685
P79	0,2565	0,258	0,3215	0,3195
P80	0,1725	0,1805	0,1815	0,1875
P1611	0,352	0,3005	0,322	0,3155
P2011	0,3105	0,2685	0,3395	0,327
P1747	0,3045	0,292	0,261	0,2465
P2044	0,565	0,225	0,218	0,205
P330	0,2725	0,217	0,242	0,184
160030	1,1885	0,195	0,1965	0,187
P1555	0,238	0,276	0,3525	0,3215
P740	0,2385	0,2505	0,2575	0,2085
P2123	0,9695	0,2045	0,237	0,2225
P56	1,3285	0,1485	0,171	0,182
P2225	0,4565	0,2115	0,2325	0,252
P2226	0,5745	0,2205	0,3595	0,37
P2324	0,2710	0,2680	0,2785	0,2790
P2325	0,2835	0,313	0,298	0,2975
M11 699	0,249	0,2475	0,29	0,276
M47302	0,236	0,2385	0,246	0,271
M47310	0,256	0,254	0,261	0,292
M6277	0,2435	0,2875	0,261	0,2555
M6669	0,2725	0,277	0,2795	0,289
P2068	0,347	0,1905	0,225	0,234
P2580	0,247	0,299	0,284	0,266
P2635	0,126	0,1715	0,1925	0,187
P2598	0,12	0,1425	0,1655	0,1385

### 7.5.2 IgA-Reaktivitäten der Patienten mit Verdacht auf Pemphigus

Patient	anti-Dsg3-IgA	anti-Dsc1-IgA	anti-Dsc2-IgA	anti-Dsc3-IgA
P1920	0,2065	0,1575	0,172	0,1975
P1805	0,276	0,332	0,323	0,291
P1601	0,335	0,1625	0,158	0,202
P489	0,3205	0,2215	0,257	0,2855
P22	0,195	0,132	0,143	0,199
P 50	0,219	0,126	0,1335	0,1655
P1911	0,247	0,137	0,1805	0,155
P79	0,193	0,1455	0,1485	0,1865
P80	0,3	0,161	0,169	0,206
P1611	0,17	0,1725	0,1945	0,204
P2011	0,138	0,151	0,1725	0,179
P1747	0,1605	0,166	0,179	0,2065
P2044	0,184	0,161	0,205	0,2475
P330	0,2355	0,158	0,183	0,188
160030	0,328	0,153	0,1895	0,239
P1555	0,1415	0,153	0,1575	0,2955
P740	0,202	0,1545	0,175	0,2045
P2123	0,1945	0,1815	0,2745	0,1925
P56	0,1885	0,2055	0,2065	0,226
P2225	0,196	0,194	0,2405	0,266
P2226	0,323	0,2465	0,2565	0,3115
P2324	0,3075	0,2755	0,2605	0,2955
P2325	0,2075	0,1515	0,1915	0,2450
M11 699	0,2665	0,2455	0,2975	0,2960
M47302	0,2260	0,2330	0,2465	0,2945
M47310	0,2125	0,2250	0,2400	0,2675
M6277	0,2370	0,2285	0,2355	0,2420
M6669	0,2385	0,2420	0,2255	0,2510
P2068	0,1745	0,1635	0,1815	0,1915
P2580	0,357	0,175	0,1725	0,207
P2635	0,1275	0,14	0,1435	0,1755
P2598	0,131	0,128	0,1355	0,163

## 7.6 IgG- und IgA-Reaktivitäten der gesunden Kontrollpersonen gegen Dsg3 und Dsc1-3 im ELISA

### 7.6.1 IgG-Reaktivitäten der gesunden Kontrollpersonen

Kontrolle	anti-Dsg3-IgG	anti-Dsc1-IgG	anti-Dsc2-IgG	anti-Dsc3-IgG
K1	0,311	0,3095	0,277	0,2605
K2	0,2325	0,26	0,2925	0,2955
K3	0,1445	0,1615	0,191	0,2085
K4	0,189	0,2535	0,3215	0,307
K5	0,324	0,326	0,3185	0,296
K6	0,2	0,2815	0,345	0,314
K7	0,2845	0,2415	0,232	0,1835
K8	0,1715	0,2365	0,2355	0,2725
K9	0,1655	0,179	0,1635	0,165
K10	0,157	0,183	0,235	0,209
K11	0,2455	0,205	0,212	0,18
K12	0,1825	0,171	0,1925	0,1685
K13	0,1705	0,177	0,277	0,2325
K14	0,241	0,243	0,2195	0,1985
K15	0,3575	0,276	0,209	0,181
K16	0,2105	0,1875	0,2025	0,1915
K17	0,1375	0,158	0,159	0,1545
K18	0,2585	0,3215	0,349	0,3595
K19	0,1395	0,1605	0,154	0,1495
K20	0,13	0,1725	0,185	0,142
K21	0,206	0,243	0,3085	0,254
K22	0,255	0,2965	0,358	0,3185

### 7.6.2 IgA-Reaktivitäten der gesunden Kontrollpersonen

Kontrolle	anti-Dsg3-IgA	anti-Dsc1-IgA	anti-Dsc2-IgA	anti-Dsc3-IgA
K1	0,235	0,221	0,247	0,3025
K3	0,122	0,125	0,1365	0,1495
K4	0,191	0,205	0,2215	0,2225
K7	0,1495	0,1455	0,1455	0,17
K8	0,1475	0,156	0,156	0,1605
K9	0,1195	0,13	0,186	0,212
K10	0,2105	0,1995	0,21	0,233
K11	0,1885	0,1875	0,212	0,2145
K12	0,2105	0,1435	0,1625	0,231
K13	0,1145	0,119	0,149	0,1815
K14	0,112	0,1125	0,13	0,203
K15	0,1215	0,125	0,142	0,168
K16	0,12	0,146	0,16	0,177
K17	0,1715	0,1645	0,206	0,1905
K18	0,124	0,124	0,1295	0,162
K19	0,203	0,18	0,162	0,181
K23	0,1565	0,1505	0,153	0,1725
K24	0,128	0,135	0,1545	0,192
K25	0,134	0,137	0,143	0,1935
K26	0,1465	0,143	0,141	0,157
K27	0,138	0,126	0,142	0,167
K28	0,178	0,1415	0,14	0,147

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:

Albert, Arnold, Bals, Barth, Basler, Baum, Baumann, Becker, Berger, Beyer, Bien, Bock, Boudriot, Christiansen, Czubayko, Donner-Banzhoff, Duda, Ellenrieder, Dünne, Gerdes, Görg, Gotzen, Gress, Grimm, Grzeschik, Hadji, Hamer, Herrmann-Lingen, Hertl, Hofmann, Höffken, Hörle, Hörsch, Hoyer, Huber, Jackisch, Jerrentrup, Jungclas, Kalder, Kalinowski, Kann, Kill, Kim-Berger, Klaus, Klenk, Klose, König, Krieg, Kroll, Krüger, Kuhlmann, Kuhn, Kühnert, Langer, Lemke, Lenz, Leonhardt, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mann, Martin, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Pagenstecher, Plant, Radsak, Ramaswamy, Remschmidt, Renz, Richter, Roeßler, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schrader, Schu, Schunk, Sesterhenn, Stiletto, Stiller, Tebbe, Teymoortash, Toussaint, Varga, Vogelmeier, Wagner H-J, Wagner U, Werner, Wiegandt, Wollmer, Wulf, Zemlin

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich während meiner Promotionsarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Hertl, der mir ermöglicht hat, diese interessante Arbeit in seinem Labor durchzuführen und der mich stets mit Anregungen und konstruktiver Kritik bei meiner Promotion unterstützt und begleitet hat. Auch möchte ich mich dafür bedanken, dass er mein Interesse an blasenbildenden Autoimmundermatosen geweckt und mir die Teilnahme an der ADF 2007 ermöglicht hat.

Besonders danken möchte ich Dr. Ralf Müller für die hervorragende und unermüdliche Betreuung, mit der er mich bei der Planung und Durchführung dieser Arbeit unterstützt hat. Vielen Dank für die geduldigen Erklärungen, die anregenden Diskussionen und die kontinuierliche Unterstützung während der gesamten Promotion.

Ich danke Dr. Andrea Niedermeier für ihre fachkundige Unterstützung und anregende fachliche Diskussionen.

Mein Dank gilt Eva Podstawa, Susanne Schwietzke, Andrea Gerber und Elke Wenzel, die mir im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite standen und mir mit unzähligen wertvollen Ratschlägen bei der Durchführung der experimentellen Arbeit geholfen haben. Ebenso gilt mein Dank Sonja Wolff-Franke, Angela Nagel und Christian Möbs für interessante fachliche Diskussionen. Auch danke ich Maria Haß für ihre Hilfe und Unterstützung bei meiner Arbeit im Labor.

Insbesondere möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben und mich in jeglicher Hinsicht unterstützen.

Wesentliche Anteile der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Müller R, Heber B, Hashimoto T, Messer G, Müllegger R, Niedermeier A, Hertl M: Autoantibodies against desmocollins in European patients with pemphigus. Clin Exp Dermatol 34: 898-903, 2009