Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Detlef Zillikens

Untersuchung zu Autoantikörpern gegen Strukturproteine der dermo-epidermalen Junktionszone bei Patienten mit Morbus Parkinson und Multipler Sklerose

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

– Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von

Amelia Beatrice Oei

aus Hamburg

Lübeck 2016

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr.med. Siegfried Görg

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2017

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 03.05.2017

–Promotionskommission der Sektion Medizin–

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis……..III

1 Einleitung 1

1.1 Bullöse Autoimmundermatosen 1

1.2 Bullöses Pemphigoid 3

1.2.1 Epidemiologie 3

1.2.2 Klinik 4

1.2.3 BP180 und BP230 5

1.2.4 Pathogenese 7

1.2.5 Diagnostik 9

1.2.6 Therapie 10

1.2.7 Prognose, Risikofaktoren und Komorbiditäten 11

1.3 Morbus Parkinson 12

1.4 Multiple Sklerose 14

2 Fragestellung 17

3 Material und Methoden 19

3.1 Patienten 19

3.2 Negativkontrollen 21

3.3 Ethikvotum 21

3.4 Antikörper 22

3.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 23

3.6 Westernblot 24

3.7 BIOCHIP®-Mosaik 26

3.8 Indirekte Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut und Affenösophagus 28

3.9 Statistik 29

4 Ergebnisse 31

4.1 Darstellung der Ergebnisse nach Testverfahren 31

4.1.1 ELISA 31

4.1.2 Westernblot 36

4.1.3 BIOCHIP®-Mosaik 37

4.1.4 Indirekte Immunfluoreszenz 38

4.2 Darstellung der Ergebnisse nach Gruppen 39

4.2.1 Morbus Parkinson 39
4.2.2 Anders neurologisch Erkrankte 39
4.2.3 Multiple Sklerose 39
4.2.4 Kontrollen 39
4.3 Deskriptive Statistik 42
4.4 Analysen 43
5 Diskussion 45
6 Ausblick 59
7 Zusammenfassung 61
8 Literaturverzeichnis 63
9 Anhang 79
9.1 Abkürzungsverzeichnis 79
9.2 Material 81
9.3 Ergebnisse aller Seren 85
10 Danksagung 97
11 Lebenslauf 99
12 Publikation 101
13 Eidesstattliche Erklärung 102

1 Einleitung

1.1 Bullöse Autoimmundermatosen

Unter diesem Begriff werden verschiedene blasenbildende Autoimmunerkrankungen zusammengefasst, die teils schwerwiegend verlaufen und in unterschiedlichem Ausmaß Haut und Schleimhäute befallen. Sie sind durch die Bildung von Antikörpern gekennzeichnet und lassen sich anhand der verschiedenen Zielantigene in der dermo-epidermalen Junktionszone unterscheiden [143,144]. (Tab. 1.1) Die dermo-epidermale Junktionszone, auch Basalmembranzone genannt, stellt die Verbindung zwischen Epidermis und Dermis in der Haut dar [17]. (Abb. 1.1)

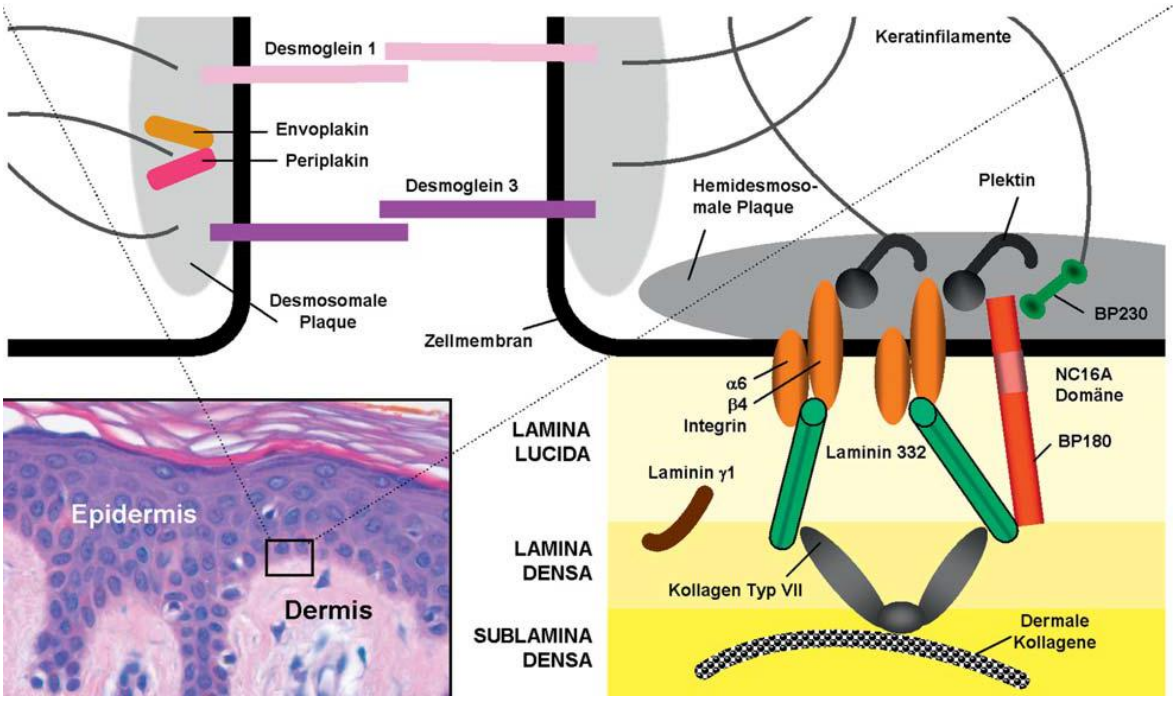


Abb. 1.1: Darstellung der dermo-epidermalen Junktionszone [144]

Die Verbindung zwischen Epidermis und Dermis wird durch die dermo-epidermale Junktionszone gewährleistet. Desmosomen vermitteln den Kontakt zwischen benachbarten Keratinozyten. Die desmosomalen Zielantigene setzen sich aus den Strukturproteinen der intrazellulären desmosomalen Plaque (Desmoplakin, Envoplakin, Periplakin) und denen der transmembranösen Cadheringruppe (Desmocollin1, Desmoglein 1 und 3) zusammen. Zwischen Epidermis und Dermis fungieren die hemidesmosomalen Strukturproteine als Verankerung. Zu diesen gehören die intrazellulär gelegenen BP230 und Plektin sowie die transmembranösen BP180 und α6β4-Integrin. Letztere stehen über Laminin 332 und Typ VII-Kollagen mit den dermalen Kollagenen in Kontakt. Autoantikörper gegen diese hemidesmosomalen Strukturproteine führen zur Spaltbildung zwischen Epidermis und Dermis.

Bei den subepidermalen Autoimmundermatosen richten sich die Antikörper gegen die Strukturproteine der dermo-epidermalen Junktionszone. Hierzu zählen die Pemphigoiderkrankungen und die Dermatitis herpetiformis Duhring. Bei letzterer sind IgA-Antikörper gegen die beiden Enzyme Transglutaminase 2 und 3 gerichtet [82]. Die Transglutaminase 3, auch epidermale Transglutaminase genannt, wurde dabei als Hauptantigen der Dermatitis herpetiformis identifiziert [138]. In der Epidermis sichern die Desmosomen die interzelluläre Adhäsion zwischen den Keratinozyten. Die Pemphiguserkrankungen weisen Antikörper gegen diese desmosomalen Proteine auf und führen somit zu einem intraepidermalen Adhäsionsverlust der Keratinozyten [144].
Durch die subepidermale Blasenbildung äußern sich Pemphigoiderkrankungen klinisch durch pralle Blasen, was ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal zu der Pemphigusgruppe darstellt [5,165,175].

Tab. 1.1: Einteilung der bullösen Autoimmundermatosen anhand der wichtigsten Zielantigene [144]

Spaltbildung	Erkrankung	Zielantigene
intraepidermal	**Pemphigus**	
	• Pemphigus vulgaris	Desmoglein 3, Desmoglein 1
	• Pemphigus foliaceus	Desmoglein 1
	• paraneoplastischer Pemphigus	Envoplakin, Periplakin, Desmoglein 3
subepidermal	**Pemphigoid**	
	• Bullöses Pemphigoid	BP180, BP230
	• Pemphigoid gestationis	BP180, BP230
	• lineare IgA-Dermatose	Lösliche Ektodomäne von BP180 (LAD-1)
	• Schleimhautpemphigoid	BP180, Laminin 332, BP230, α6β4-Integrin
	• Lichen planus pemphigoides	BP180, BP230
	• Anti-Laminin γ1/p200 Pemphigoid	Laminin γ1, p200 Protein
	• Epidermolysis bullosa acquisita	Typ VII Kollagen
	Dermatitis herpetiformis Duhring	Epidermale Gewebstransglutaminase

LAD-1= Lineare IgA-Dermatose Antigen 1

1.2 Bullöses Pemphigoid

Das bullöse Pemphigoid (BP) ist eine chronische Autoimmunerkrankung, die durch pralle Blasen als Primäreffloreszenz gekennzeichnet ist und die häufigste blasenbildende Autoimmundermatose darstellt. Es handelt sich um eine Erkrankung des höheren Alters, bei der durch zirkulierende Antikörper gegen die zwei Strukturproteine BP180 und BP230 in der dermo-epidermalen Junktionszone eine subepidermale Spaltbildung erzeugt wird [149].

1.2.1 Epidemiologie

Die Inzidenz des BP liegt in Europa bei 12,1-43 Neuerkrankungen jährlich pro einer Millionen Einwohner, wobei je nach Altersgruppe und Region erhebliche Unterschiede zu verzeichnen sind [14,60,77,95,111]. Das Durchschnittsalter liegt zwischen 75 und 80 Jahren [14,95]. Als eine Erkrankung des höheren Lebensalters steigt das Risiko ab 60 Jahren an einem BP zu erkranken deutlich an [80], sodass bei den über 80-Jährigen eine Inzidenz von über 300 Neuerkrankungen/1 Million/Jahr ermittelt werden kann [77]. Auch bei Kindern wurden einzelne Krankheitsfälle beobachtet [30,52], wobei sich die Erkrankung etwas anders als bei Erwachsenen zu äußern scheint: Typisch ist hier ein Befall der Hand- und Fußsohlen und auch das Gesicht ist in 50% der Fälle betroffen. Pathogenese und diagnostischen Kriterien entprechen jedoch denen des adulten BP [39,59,154]. Kürzlich konnte die Prävalenz des BP in Deutschland auf 259/1 Million Einwohner bestimmt werden, demzufolge es etwa 21.000 Patienten mit dieser Erkrankung in Deutschland gibt [73].

In den vergangenen Jahren konnte ein deutlicher Anstieg der Inzidenz ausgemacht werden [95]: In Frankreich kam es innerhalb von 15 Jahren zu einer Verdreifachung der Neuerkrankungen [11,77], und auch in Deutschland und Großbritannien hat sich die Inzidenz des BP innerhalb von zehn Jahren vervielfacht (zwei- bis fünffach) [14,95,193]. Erklärungsansätze dafür sind die zunehmend alternde Bevölkerung und bessere diagnostische Möglichkeiten [143]. Eine weitere These ist, dass sich die Zunahme einiger neurologischer Erkrankungen auf die Inzidenz des BP auswirkt [77], da in mehreren Studien ein klarer Zusammenhang zwischen verschiedenen neurologischen Krankheiten und dem BP aufgezeigt werden konnte [19,29,94]. Dies gilt ebenso für den zunehmenden Gebrauch einiger Medikamente, wie einzelne Diuretika und Neuroleptika, die als Risikofaktoren für das BP gelten [77].

1.2.2 Klinik

Klinisch kann sich das BP verschiedenartig manifestieren. Charakteristisch sind pralle, serös oder hämorrhagisch gefüllte Blasen auf erythematöser oder gesund erscheinender Haut [5]. Zusätzlich können Erosionen, Krusten und urtikarielle Plaques vorkommen [149]. Meist heilen die Läsionen narbenlos ab, es kann aber auch zu einer postinflammatorischen Hyperpigmentierung kommen [54]. Prädilektionsstellen sind die Beugeseiten der Extremitäten, das untere Abdomen und die Intertrigines [149]. Eine Schleimhautbeteiligung ist beim BP selten und kommt bei etwa 10-20% der Patienten in der Mundschleimhaut vor [143,175]. Typisch ist auch der ausgeprägte Pruritus, der von fast allen Patienten angegeben wird [5,83]. In bis zu 20% der Fälle kann den Blasen ein nicht-bullöses Prodromalstadium vorausgehen, das Wochen bis Monate andauern kann und in manchen Fällen sogar die einzige Krankheitsmanifestation bleibt [39]. In diesem Stadium kann das BP als einziges Symptom Juckreiz aufweisen oder unter dem klinischen Bild eines Ekzems, einer Urtikaria oder einer Prurigo simplex subacuta auftreten [39,92,175,182]. Bei älteren Patienten mit unklarem Juckreiz sollte daher immer eine BP-Diagnostik erfolgen [144].

(a)

(b)

Abb. 1.2 Bullöses Pemphigoid [59]
(a) Blasen, Erosionen und hämorrhagische Krusten auf erythematöser Haut in der Glutealregion
(b) pralle Blasen und Erosionen am Arm

1.2.3 BP180 und BP230

BP180 (BPAG2 oder Kollagen XVII) stellt eine transmembranöse Komponente der Hemidesmosomen dar und besteht aus einem intrazellulären N-Terminus und einem extrazellulären C-Terminus [71]. BP180 reicht intrazellulär vom hemidesmosomalen Plaque der basalen Keratinozyten zur Lamina densa der Basalmembran [112]. Der intrazelluläre Anteil interagiert mit dem N-Terminus von BP230, Plektin und der β4-Untereinheit [72,87], während die Ektodomäne mit der α6-Untereinheit und Laminin 332 in Kontakt steht [71,87]. Als Verbindung zwischen intra- und extrazellulären Komponenten der hemidesmosomalen Plaque stellt BP180 eines der zentralen Verankerungsproteine der dermo-epidermalen Junktionszone dar [125]. Der extrazelluläre Anteil besteht aus 15 kollagenösen Segmenten, die sich mit 16 nicht-kollagenösen Subdomänen abwechseln [56]. Die NC16a-Domäne, welche an die Zellmembran des basalen Keratinozyten grenzt, stellt die immundominante Region von BP180 dar [46,57,70,173]. Etwa 85% der BP-Patienten weisen Antikörper gegen diese Domäne auf [144]. Von dieser abgesehen finden sich allerdings sowohl intra- als auch extrazellulär weitere immunreaktive Epitope, gegen die Autoantikörper gefunden werden können [114,123,173]. Bei 54%-96% der Seren von BP-Patienten kann Reaktivität mit Epitopen außerhalb der NC16a-Domäne nachgewiesen werden [44,46]. Die Lokalisation der Epitope mit entsprechender Antikörperbildung scheint auf bestimmte klinische Ausprägungen und Verläufe zu schließen. So konnte zwischen dem Anti-BP180-NC16a-Antikörpertiter und der Krankheitsaktivität ein Zusammenhang aufgezeigt werden [50,141], sodass der Serumspiegel zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs und der Therapiekontrolle geeignet ist [145]. Ob dieser Zusammenhang auch für den extrazellulären C-Terminus zutrifft, konnte bislang nicht eindeutig bewiesen werden [46,70], jedoch scheint es bei Reaktivität gegen selbigen vermehrt zu einer Schleimhautbeteiligung zu kommen [44,70]. Die Bindung an intrazelluläre Epitope ist vor allem in früheren Krankheitsstadien vorzufinden [44].

Die Antikörper gegen BP180 und BP230 lassen sich hauptsächlich dem IgG-Isotyp, genauer gesagt IgG_1 und IgG_4, zuordnen [47,70,163]. Darüber hinaus sind auch IgE- und IgA-Antikörper nachweisbar [47,88], wobei ein hoher IgE-Antikörpertiter mit schwereren Krankheitsverläufen assoziiert ist [8,42,75]. Allerdings kam eine kürzlich erschienene chinesische Studie zu dem Schluss, dass die IgE-Antikörpertiter wahrscheinlich erst im Verlauf der Erkrankung – nicht aber in frühen Stadien – mit der Krankheitsaktivität korrelieren [15].

BP230 (BPAG1) liegt intrazellulär und gehört der Plakinfamilie an [133,164]. Bestehend aus einem zentralen stabförmigen Teil [139], wird dieser zu beiden Seiten von einer globulären Enddomäne abgeschlossen [17]. Als Bestandteil der hemidesmosomalen Plaque interagiert BP230 mit BP180 und der β4-Untereinheit des α6β4-Integrins [87,139].

Als immundominantes Epitop wurde die C-globuläre Domäne ausgemacht, jedoch scheinen sich auch immunreaktive Bereiche im N-terminalen Abschnitt zu befinden [16,89,163]. Bei 60%-70% der BP-Patienten lassen sich im Serum BP230-Antikörper nachweisen [89,187]. Im Gegensatz zu BP180 scheint der BP230-Antikörpertiter allerdings nicht mit der Krankheitsaktivität zu korrelieren [46,187].

Welche Rolle BP230 in der Pathogenese spielt, ist bislang unklar [90]. In Tiermodellen konnte die Pathogenität der BP230-Antikörper und ihre Bedeutung für die Krankheitsentstehung nicht eindeutig gezeigt werden [48,63,86].

Antikörper gegen BP180 und BP230 wurden ebenfalls bei einem Teil von gesunden Blutspendern nachgewiesen [127]. Auch Antikörper anderer Autoimmunerkrankungen wurden bei gesunden Personen detektiert, allerdings ist nach wie vor unklar, ob dies ein Indikator für die klinische Manifestation der Autoimmunkrankheit ist [155].

Die Antigene BP180 und BP230 sind nicht nur in der Haut vorzufinden, sondern wurden ebenfalls im Gehirn nachgewiesen. Die Verbindung zwischen beiden Organen lässt sich angesichts des gemeinsamen embryonalen Ursprungs, dem Neuroektoderm, erklären [166]. Von BP230 sind verschiedene Isoformen bekannt: neben der epithelialen Form liegen auch eine muskuläre und neuronale Form vor, die allesamt durch das Dystonin-Gen kodiert werden [20,101]. Guo et al. zeigten am Tiermodell, dass Mutationen im Dystonin-Gen, abgesehen von einer Schädigung der Haut, zu schwerer Dystonie und sensorischer Nervendegeneration führen [61]. Die pathogenetische Bedeutung des Dystonin-Gens zeigt sich auch bei Mäusen in der erblichen neurodegenerativen Erkrankung Dystonia musculorum, bei der es durch dort stattgefundene Mutationen zur Ausbildung der Erkrankung mit charakteristischer sensorischer Ataxie kommt [20]. Dystonin wurde vor allem in kranialen und spinalen sensorischen Ganglienzellen gefunden sowie im extrapyramidalen System und im Kleinhirn. In Motorneuronen wurde es ebenfalls nachgewiesen, jedoch scheint es dort bei der Krankheitsentstehung von Dystonia musculorum unbeteiligt zu sein [13]. Claudepierre et al. konnten BP180 und BP230 bei Ratten im Kleinhirn, Bulbus olfactorius und in der Retina zeigen. Im Kortex wurde dagegen nur BP230 und kein BP180 gefunden [33].

Seppänen et al. wiesen BP180 erstmals im menschlichen Gehirn nach, wobei die Antigenexpression je nach Hirnregionen variiert: Vorwiegend findet sie in den motorischen Hirnnervenkernen, den Pyramidenzellen des Hippocampus, sowie den Betz-Zellen des Motorkortex statt [157,159]. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich BP180 intrazellulär gehäuft in Lipofuszin-Granula befindet [158].

1.2.4 Pathogenese

Für die Antikörperbildung gegen BP180 und BP230 sind CD4-positive T-Zellen verantwortlich [103]. Hierfür scheint das HLA-Klasse-II-Allel HLA-DQB1*0301 von entscheidender Bedeutung zu sein [43], da es als Suszeptibilitätsgen vermutlich an der Auslösung einer T-Zellantwort gegen immundominante Epitope von BP180 beteiligt ist [21]. So konnte neben der Assoziation von BP und dem Vorliegen von HLA-DQB1*0301 gezeigt werden, dass es bei gesunden Trägern dieses Allels, zu einer BP180-spezifischen T-Zell-Immunreaktivität kommt [21].

Bei der Pathogenese scheint BP180 eine tragende Rolle zuzukommen. Dies konnte in mehreren Studien tierexperimentell aufgezeigt werden. Den Anfang machten Liu et al. 1993: Nachdem Kaninchen mit murinem BP180-NC15a immunisiert und die daraus entstandenen Antikörper auf neonatale Mäuse übertragen wurden, führte dies zu einer subepidermalen Blasenbildung – klinisch, histologisch und immunologisch der bei BP-Patienten entsprechend [104]. Die Ergebnisse konnten später in einer weiteren Studie, insbesondere in Hinblick auf die Relevanz der NC16a-Domäne untermauert werden [116]. Neben diesen passiven Antikörpertransfermodellen gelang es Hirose et al. ein aktives Modell zu etablieren, bei dem die Immunisierung von immunkompetenten Mäusen mit murinem BP180 zur Ausbildung der klinisch relevanten Charakteristika führte [68]. An ex-vivo-Modellen mit Kryoschnitten konnte gezeigt werden, dass die Präsenz des Fc-Anteils der Antikörper Voraussetzung für die Spaltbildung beim BP ist [162,189]. Schulze et al. konnten die Bedeutung der Fcγ-Rezeptoren in einem neuen experimentellen Modell herausstellen, bei dem Anti-Murin-BP180-NC15a-Antikörper von Kaninchen auf adulte Mäuse übertragen wurden [151]. Hier zeigte sich, dass die Fcγ-Rezeptoren III und IV maßgeblich an der Ausbildung der BP-typischen Läsionen beteiligt sind, wohingegen der inhibierende Rezeptor IIB eine protektive Rolle einnimmt. Die Mäuse, denen der FcγIIB-Rezeptor fehlte, erkrankten deutlich schwerer als die Tiere in der Kontrollgruppe. Vor allem in Hinblick auf neue therapeutische Strategien ist die Relevanz der

Fcγ-Rezeptoren interessant und könnte als spezifischeres Behandlungsverfahren die derzeitigen meist nebenwirkungsreichen Therapieoptionen ergänzen [151].

Die Antigen-Antikörper-Bindung löst eine Kaskade aus, die verschiedene Komponenten umfasst: die Aktivierung des Komplementsystems sowie die Anlockung von Entzündungszellen [74]. Die Daten zu Ersterem sind widersprüchlich: Während Liu et al. im Tiermodell zeigten, dass Anti-BP180-Antikörper die Spaltbildung nur mittels Komplementaktivierung auslösten [105], stellten Natsuga et al. fest, dass vermutlich auch Komplement-unabhängige Signalwege zur Krankheitsentstehung führen können [115]. Diese Ergebnisse konnten in weiteren Studien bestätigt werden [40,176].

Die Freisetzung der proinflammatorischen Interleukine 6 und 8 [142], die Degranulation von Mastzellen, die Einwanderung von Makrophagen und Granulozyten sowie deren Ausschüttung von Proteasen und reaktiven Sauerstoffspezies stellen weitere bedeutende Schritte in der Blasenbildung dar [143]. Mastzellen spielen eine tragende Rolle in der Anlockung von neutrophilen Granulozyten [27,28]. Diese setzen unter anderem die Neutrophile Elastase sowie die Gelatinase B (Matrixmetalloproteinase-9) frei. Die Gelatinase B inaktiviert dabei den α1-Proteinase-Inhibitor, einen physiologischen Hemmer der Neutrophilen Elastase, sodass diese ihrer Funktion nachkommen kann und durch die Spaltung extrazellulärer Matrixproteine, wie zum Beispiel von BP180, zu einer subepidermalen Spaltbildung führt [106–108,160].

Wie schon erwähnt, besitzt BP180 verschiedene immundominante Epitope, die durch Autoantikörper erkannt werden. Diese Tatsache kann durch das Modell des „Epitope spreading“ erklärt werden. Dabei kommt es durch einen autoimmunen oder entzündlichen Prozess zu einem Gewebeschaden, der Antigene, die zuvor immunologisch unzugänglich waren, demaskiert und so eine zweite Autoimmunantwort hervorruft [23]. So können sich im Rahmen einer chronischen Autoimmunerkrankung die Zielstrukturen im Krankheitsverlauf durch inflammatorische Vorgänge verändern [23,177]. Dieses Phänomen ist bei diversen Autoimmunerkrankungen, wie der Myasthenia gravis und der Multiplen Sklerose vorzufinden [178].

Beim BP finden sich intra- sowie intermolekulares „Epitope spreading“. Dabei lässt sich primär intramolekulares „Epitope spreading“ nachweisen, das von zuerst vorliegender IgG-Reaktivität gegen die Ektodomäne von BP180 mit nachfolgender Reaktivität gegen intrazelluläre Epitope gekennzeichnet ist. Darauf folgt intermolekular die Entwicklung von Reaktivität gegen BP230 [45]. Die Vorgänge finden in frühen Krankheitsstadien statt und sind

mit schwereren Krankheitsformen assoziiert. Auch ist es wahrscheinlich, dass sie die variablen Ausprägungsmuster und Verläufe beim BP erklären können [45]. Erwähnenswert ist auch, dass der Prozess immer unidirektional abzulaufen scheint. Der BP230-Reaktivität geht stets Reaktivität gegen BP180 voraus, die Immunantwort gegen intrazelluläre folgt der gegen extrazelluläre Epitope [45,65,90].

1.2.5 Diagnostik

Zur Differenzierung und Diagnosestellung bullöser Autoimmundermatosen werden neben dem klinischen Bild die direkte und indirekte Immunfluoreszenz sowie histologische und serologische Untersuchungen herangezogen [149]. Laborchemisch lässt sich beim BP oftmals ein erhöhtes Gesamt-IgE [1,2,8] und in 50% der Fälle eine periphere Eosinophilie nachweisen [12,22].

Die histologische Untersuchung, als orientierende Methode, zeigt den Ort der Blasenbildung [130]. Beim BP verläuft diese typischerweise subepidermal, sodass das Blasendach von der gesamten Epidermis ausgemacht wird. In dem Entzündungsinfiltrat finden sich vorwiegend neutrophile und eosinophile Granulozyten, aber auch Makrophagen und Lymphozyten [149]. Den diagnostischen Goldstandard stellt die direkte Immunfluoreszenz dar [146]. Dabei wird periläsional eine Biopsie entnommen, um gewebegebundene Antikörper nachzuweisen [130]. Charakteristisch beim BP sind lineare Ablagerungen von IgG und C3 an der Basalmembranzone, aber auch IgA und IgE lassen sich mitunter nachweisen [143].

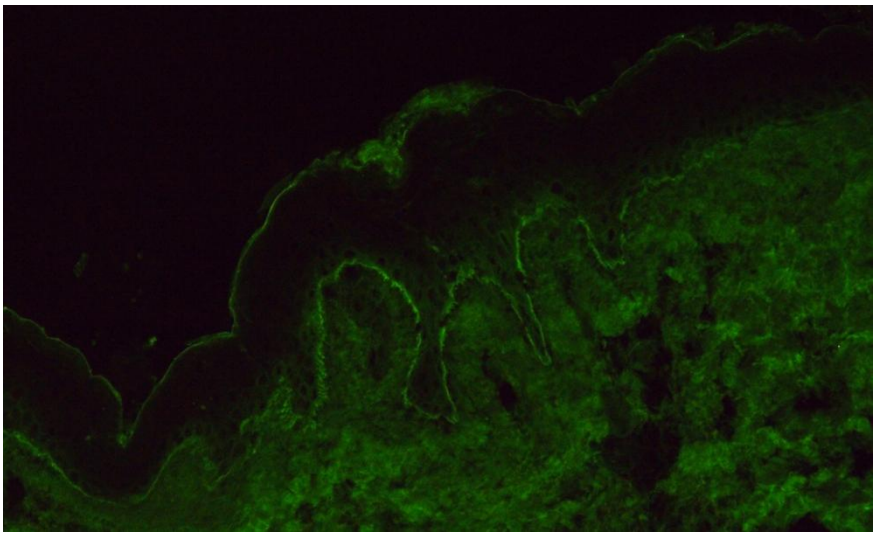


Abb. 1.3 Direkte Immunfluoreszenz beim bullösen Pemphigoid

In einer periläsionalen Biopsie sind lineare Ablagerungen von IgG an der dermo-epidermalen Junktionszone zu sehen

Die indirekte Immunfluoreszenz stellt eine Screeningmethode in der serologischen Diagnostik bullöser Autoimmundermatosen dar. Für das BP hat sich als sensitivstes Substrat humane Spalthaut etabliert, bei der durch Inkubation mit 1M NaCl-Lösung eine dermo-epidermale

Spaltbildung hervorgerufen wurde. Die Antikörper gegen BP180 und BP230 binden typischerweise am Blasendach, also der epidermalem Seite des artifiziellen Spalts [146]. Hier lassen sich bei 73-96% der BP-Patienten zirkulierende Antikörper nachweisen [140]. Die indirekte Immunfluoreszenz lässt sich auch mit Affenösophagus als Substrat durchführen. Die Sensitivität liegt mit 60-70% jedoch unter der der Spalthaut [140].

Um die Antikörper genauer zu charakterisieren, werden weitere serologische Untersuchungsmethoden herangezogen. Antikörper gegen BP180-NC16a und BP230 können mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Systemen nachgewiesen werden. Besonders der BP180-NC16a-ELISA zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität von 87% und einer Spezifität von 98% aus [170]. Bei Verwendung beider Testsysteme liegt die Sensitivität bei ca. 90% [146]. Di Zenzo et al. zeigten in einer prospektiven Multicenter-Studie, dass sich durch die Kombination von BP180- und BP230-ELISA alle Seren von BP-Patienten detektieren ließen [46]. Vor allem der BP180-NC16a-ELISA ist in Hinblick auf seine Korrelation mit der Krankheitsaktivität ein nützliches Instrument zur Verlaufskontrolle und bei Therapieentscheidungen [145]. Zur weiteren Diagnostik bedient man sich des Westernblots mit epidermalen Extrakten oder kultivierten Keratinozyten [130].

Der BIOCHIP® Mosaik basiert auf dem Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz und stellt ein neues serologisches Screeningverfahren dar, das sich durch gleichzeitiges Testen sechs unterschiedlicher Substrate mit einer einzelnen Serumprobe auszeichnet. Als Substrate werden 1M NaCl-separierte Spalthaut, Affenösophagus, BP180-NC16a-Tetramere, Desmoglein-1-, Desmoglein-3- und BP230gC-exprimierende humane HEK293-Zellen benutzt [7,149]. Der BIOCHIP® Mosaik weist für BP180 eine hohe Sensitivität zwischen 83 und 100% auf und erreicht bei der Spezifität sogar Werte von annähernd 100%. Bei vergleichbar hoher Spezifität liegt die Sensitivität für BP230 dagegen mit 39-55% deutlich darunter, jedoch stellt der BIOCHIP® Mosaik hinsichtlich des Nachweises von BP180 wohl eine mögliche Alternative oder Ergänzung zu den konventionellen Methoden dar [7,171,190].

1.2.6 Therapie

Neben der Eröffnung der Blasen, der antiseptischen sowie antipruriginösen Behandlung besteht die Therapie des BP vorrangig in der Gabe topischer und systemischer Glukokortikoide [149,192]. Die topische Applikation von 0,05% Clobetasolpropionat hat sich bei moderater Erkrankung als gleichwertige Therapie im Vergleich zu oraler Kortison-Gabe

erwiesen und ist selbst bei ausgeprägtem Befall der systemischen Behandlung in Wirksamkeit, Nebenwirkungsrate und 1-Jahres-Mortalität überlegen [51,78,79].

Zur Steroideinsparung kommen unterschiedliche immunsuppressive Medikamente zum Einsatz. Neben Azathioprin, Dapson, Methotrexat, Mycophenolatmofetil und Doxycyclin [49,140,143] wurde zuletzt auch für den monoklonalen Anti-IgE-Antikörper Omalizumab [188] und den Anti-CD20-Antikörper Rituximab ein Nutzen nachgewiesen [64]. Ein weiteres Therapieverfahren stellt die Immunadsorption dar. Hier werden selektiv Immunglobuline aus dem Blutkreislauf entfernt, sodass es zu einer raschen Verbesserung der Symptome kommt. Diese Therapieoption ist allerdings schweren und/oder therapierefraktären Verläufen vorbehalten [147].

1.2.7 Prognose, Risikofaktoren und Komorbiditäten

Die Mortalität des BP liegt im ersten Jahr nach Diagnosestellung bei 19-41% [38,77,95,131,135]. Dabei tragen, neben einem hohen Alter und reduziertem Allgemeinzustand, eine hochdosierte systemische Glukokortikoid-Therapie, ein generalisierter Hautbefall, ein niedriger Serumalbumin-Spiegel und Begleiterkrankungen wie Demenz zu einem erhöhten Mortalitätsrisiko bei [38,51,78,131,135].

Verschiedene Triggerfaktoren zur Auslösung eines BP wurden beschrieben. So scheinen Verbrennungen, Verletzungen, Insektenstiche, Strahlentherapie, UV-Licht, Impfungen und auch Infektionen zur Ausbildung der Dermatose zu führen [41,110,179,181]. Ein weiterer Risikofaktor, der die Bildung von Autoantikörpern gegen BP180 und BP230 induziert, ist chronischer Pruritus. Die Datenlage dazu ist allerdings strittig [6,148].

Eine vielfach in Studien untersuchte und aufgezeigte Assoziation, ist die zwischen dem BP und neurologischen Erkrankungen. Bei etwa 30-50% der BP-Patienten liegt eine neurologische Erkrankung vor [37,76,168]. Besonders häufig wird von einer Assoziation mit Demenz, Morbus Parkinson, Epilepsie, Multipler Sklerose und Schlaganfällen berichtet mit Odds Ratios (OR) von 2,2-10,7 [3,19,29,37,94,96,168]. In einer populationsbasierten Studie mit 5.296 Multiple Sklerose-Patienten und 26.478 passenden Kontrollen hatten die Patienten eine OR von 6,7 (95% CI 1,5-29,9) ein BP zu entwickeln [96]. Des Weiteren wurden auch Bettlägerigkeit, Schizophrenie und uni- oder bipolare Störungen (OR von 2,2, 2,6 und 5,3) in Zusammenhang mit dem BP gebracht [3,29]. Die Manifestation des BP folgt dabei der neurologischen Erkrankung mit einer Latenzzeit von 5,5 Jahren [37,168].

Die ermittelten Assoziationen und die Tatsache, dass BP180 und BP230 auch im Gehirn nachgewiesen wurden, lassen vermuten, dass neurodegenerative oder entzündliche Vorgänge die Krankheitsentstehung des BP triggern. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass es während des Krankheitsprozesses im zentralen Nervensystem (ZNS) zur Schädigung der Blut-Hirn-Schranke und Exponierung der beiden Antigene kommt, die zur einer Immunantwort mit Bildung von Anti-BP180- und BP230-Antikörpern führen [3,166].

Auch die Einnahme einiger Medikamente ist mit dem Auftreten des BP assoziiert. Eine Assoziation konnte für Diuretika wie Aldosteron-Antagonisten, Phenothiazide und Schleifendiuretika als auch für eine langjährige Neuroleptika-Einnahme nachgewiesen werden [3,4,109].

Hinsichtlich der Assoziation mit malignen Erkrankungen gibt es widersprüchliche Daten. Während in der Literatur immer wieder vom gemeinsamen Auftreten mit verschiedenen Tumoren berichtet wurde [31,119,180], konnten mehrere Studien keinen Zusammenhang aufzeigen [76,172]. In einer kürzlich veröffentlichen Arbeit wurden Krankenkassendaten ausgewertet und über 1.700 BP-Patienten mit 10.000 alters- und geschlechtsentsprechend angepassten Kontrollen verglichen [150]. Hier zeigte sich eine Assoziation mit hämatologischen Neoplasien. Der fehlende Zusammenhang mit soliden Tumoren konnte jedoch bestätigt werden und legt nahe, dass ein zuvor aufgezeigter aus der erhöhten Rate von Malignomen bei Älteren resultiert. Weitere Erkrankungen, die in Verbindung mit dem BP gebracht werden, sind Diabetes mellitus Typ I und Psoriasis [32,58,121,179]. Man geht davon aus, dass bei der Psoriasis die entzündlichen Prozesse an der Basalmembranzone oder deren therapeutische UV-Bestrahlung die Dermatose triggern [84,184].

1.3 Morbus Parkinson

Der Morbus Parkinson stellt die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung dar und ist durch einen Dopamin-Mangel gekennzeichnet, der zu pathognomischen Störungen der Bewegung führt [118]. Die Inzidenz liegt bei 8 - 18 pro 100.000 Einwohner im Jahr. Bei der Bevölkerung über 60 Jahre ist ein starker Anstieg der Neuerkrankungen zu verzeichnen, sodass in dieser Altersgruppe 1% von der Krankheit betroffen sind [97].

Man nimmt an, dass es sich um eine Erkrankung multifaktorieller Genese handelt, bei der Suszeptibilitätsgene, Alterungsprozesse und Umweltfaktoren eine Rolle spielen [136]. Verschiedene Genmutationen sind bekannt, die mit Morbus Parkinson assoziiert sind.

Allerdings treten wohl 90% der Parkinson-Erkrankungen sporadisch auf und nur 10% sind genetisch bedingt [97].

Pathophysiologisch wird die Krankheit durch den Untergang melaninhaltiger, dopaminerger Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra gekennzeichnet, was zu einem Mangel an Dopamin und somit zu Störungen der Bewegungskoordination führt. Die neurodegenerativen Veränderungen betreffen ebenfalls den Locus coeruleus, den Raphekern und den Nucleus basalis Meynert [100]. Typisch ist auch das Vorkommen von Lewy-Körperchen. Dabei handelt es sich um eosinophile, zytoplasmatische Einschlüsse, die nicht krankheitsspezifisch sind und sich auch bei etwa 10% der klinisch unauffälligen über 60-Jährigen nachweisen lassen [93]. Unklar ist die Rolle von neuroinflammatorischen Prozessen in der Pathogenese. In post-mortem Studien wurden Mikroglia, zytotoxische T-Lymphozyten und Zytokine in der Substantia nigra von Parkinson-Patienten gefunden [69]. Ob dies nun aber Folge der neurodegenerativen Vorgänge ist, oder diese verursacht, ist weiterhin unklar [126,137].

Klinisch äußert sich der Morbus Parkinson in der typischen Symptomtrias Bradykinese, Rigor und Tremor. Charakteristisch ist eine asymmetrische Symptommanifestation, posturale Instabilität mit Sturzneigung und ein verändertes Gangbild, das sich durch Verlangsamung, kleine Schritte und fehlendes Mitschwingen der Arme äußert [118]. Neben den motorischen Symptomen treten auch vegetative Beschwerden sowie neuropsychiatrische und kognitive Störungen auf. Dabei sind vor allem Depression und Demenz zu nennen, wobei Letztere im Spätstadium fast 80% der Patienten betrifft [25].

Die Diagnose des Morbus Parkinson wird klinisch gestellt. Wichtig dafür sind eine ausführliche Anamnese und klinische Untersuchung, um eventuelle Differentialdiagnosen wie einen Medikamenten-induzierten Parkinsonismus oder die Parkinson-Plus-Syndrome (Multisystematrophie, Kortikobasale Degeneration und Progressive supranukleäre Blickparese) auszuschließen [136]. Eine weitere Möglichkeit stellt die Diagnosis ex juvantibus mittels L-Dopa-Gabe dar. Bildgebende Verfahren wie die Magnetresonanztomographie (MRT) oder die Positronen-Emissions-Tomographie sind in unklaren Fällen indiziert, gehören aber nicht zur Routinediagnostik. Eine endgültige Diagnose lässt sich nur post-mortem stellen [118].

Der Morbus Parkinson wird vorrangig medikamentös behandelt mit dem Ziel, den Dopamin-Mangel auszugleichen. L-Dopa stellt dabei das wirksamste Medikament zur Behandlung der motorischen Symptome dar und so werden nur bei Kontraindikationen oder jungen Patienten andere Wirkstoffe L-Dopa vorgezogen. In diesen Fällen kommen Dopamin-Agonisten, MAO-

B-Hemmer, Amantadin, Anticholinergika oder Betablocker zum Einsatz [36]. Eine operative Möglichkeit ist die tiefe Hirnstimulation, bei der im Bereich des Thalamus Elektroden implantiert werden, über die eine hochfrequente Stimulation der Hirnareale erfolgt [118]. Die medikamentöse Behandlung der nicht-motorischen Symptome sowie konservative Behandlungsansätze wie Physio- und Psychotherapie stellen weitere Grundpfeiler der Therapie dar [25,100].

1.4 Multiple Sklerose

Bei der Multiplen Sklerose handelt es sich um eine chronisch verlaufende, demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems, die zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen des jungen Erwachsenenalters zählt [128]. In Europa sind von der Erkrankung 83-108/100.000 Einwohner betroffen. Hierbei sind, bei starker Abhängigkeit vom geographischen Breitengrad, die höchsten Prävalenzraten in nördlichen Ländern zu verzeichnen. Die Anzahl der Neuerkrankungen beträgt jährlich 4,3/100.000 Einwohner, wobei eine steigende Tendenz zu beobachten ist [10,128]. Die Krankheit manifestiert sich meistens zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr und betrifft doppelt so häufig Frauen wie Männer [34].
Die Ätiologie der Multiplen Sklerose ist unklar. Man geht davon aus, dass sich die Erkrankung bei genetisch prädisponierten Menschen nach Einfluss bestimmter Umweltfaktoren entwickelt [129]. In Studien konnte eine familiäre Häufung bei 15% der Patienten aufgezeigt werden [34]. Auch scheint das Auftreten bestimmter Histokompatibilitätsantigene (HLA) mit dem Auftreten von Multipler Sklerose assoziiert zu sein. Als weitere Risikofaktoren werden Infektionen mit dem Ebstein-Barr-Virus, Rauchen, der Einfluss von Vitamin D und die Herkunft hinsichtlich des Breitengrades diskutiert [129]. Weiter wird angenommen, dass autoimmune Prozesse bei der Multiplen Sklerose von Bedeutung sind. Durch das Zusammenspiel genetischer Faktoren und Umwelteinflüsse kommt es zu einer Aktivierung autoreaktiver T-Zellen, welche zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke mit Einwanderung von T-Zellen führen. Binden diese an Autoantigene, die wahrscheinlich Sequenzen von Myelin entsprechen, kommt es zur Auslösung einer Immunreaktion mit nachfolgender Entzündung und Schädigung der Myelinscheiden [117]. Es wird also davon ausgegangen, dass der Krankheitsprozess durch eine periphere Immunantwort ausgelöst wird und dieser im Verlauf durch Immunreaktionen im ZNS dominiert wird. Neurodegenerative Vorgänge spielen offenbar eine nachrangige Rolle [67].

Pathologisch kennzeichnend sind die Entmarkungsherde (Plaques), die im gesamten ZNS disseminiert auftreten können und bevorzugt die weiße Substanz befallen. Sie führen zu einer Schädigung der Myelinscheiden, wodurch die Nervenleitung beeinträchtigt wird und je nach Ort der Schädigung verschiedene Funktionsstörungen resultieren. Besonders häufig treten die Plaques periventrikulär, am Hirnstamm, Sehnerv, Kleinhirn und Rückenmark auf. Auch zu Axonschädigungen kommt es früh im Krankheitsverlauf [117].

Da die Multiple Sklerose das gesamte ZNS betreffen kann, ist das klinische Bild äußerst vielfältig. Als Erstsymptome kommen häufig die einseitige Optikusneuritis, Störungen der Okulomotorik, Sensibilitätsstörungen und motorische Störungen vor, die sich als Paresen, Spastik, Gleichgewichtsstörungen und in einem veränderten Gangbild äußern können [117,174]. Des Weiteren kommen neben Blasen- und sexuellen Funktionsstörungen kognitive Beeinträchtigungen vor, die die Aufmerksamkeit, das Gedächtnis und die Informationsverarbeitung betreffen. In späteren Stadien kann es zudem zum Auftreten von Demenz kommen [34]. Ein weiteres typisches Symptom ist die Fatigue, welche über 70% der Patienten betrifft. Es bezeichnet ein ausgeprägtes Gefühl der Erschöpfung und Energielosigkeit und wird von den Patienten als sehr belastend empfunden [174]. Eines der wenigen krankheitsspezifischen Symptome stellt das Uhthoff-Phänomen dar, bei dem es zu einer Verschlechterung der Symptome bei Erhöhung der Körpertemperatur kommt [35]. Als weiteres Symptom ist das Lhermitte-Zeichen zu nennen, welches Parästhesien entlang der Wirbelsäule bei Beugung des Kopfes bezeichnet [34].

Bei der Erkrankung lassen sich verschiedene Verlaufsformen unterscheiden: der schubförmig-remittierende, der primär chronisch-progrediente und der sekundär chronisch-progrediente Verlauf. 80% der Patienten weisen einen primär schubförmigen Verlauf auf, der aber in über der Hälfte der Fälle in eine progrediente Verlaufsform übergeht [35,117].

Gerade im Anfangsstadium ist wegen der unspezifischen und vielfältigen Symptome die Diagnosestellung schwierig, weshalb neben den klinischen Befunden auch weitere Untersuchungsverfahren wie das MRT, die Liquoruntersuchung und die Messung evozierter Potenziale berücksichtigt werden. Das wesentliche Kriterium stellt dabei die zeitliche und räumliche Dissemination der Entzündungsherde dar [128].

Die Therapie umfasst die Behandlung akuter Schübe, die Langzeitbehandlung, um eine Chronizität und Progredienz zu verhindern und symptomatische Therapiemaßnahmen. Bei akuten Schüben sind hohe Kortikosteroiddosen das Mittel der Wahl, da sie rasch zu einer Verbesserung der Schubsymptomatik führen. Als Schubprophylaxe haben sich

immunmodulatorische Medikamente wie Interferon β, Glatirameracetat und Teriflunomid sowie immunsuppressive Substanzen wie Azathioprin, Mitoxantron und Fingolimod durchgesetzt [34,185]. Des Weiteren kommen auch Dimethylfumarat und monoklonale Antikörper wie beispielsweise Alemtuzumab (CD52) oder Daclizumab (CD25) in der Therapie der Multiplen Sklerose zum Einsatz [185]. Der progrediente Verlauf der Erkrankung und die meist einhergehende Invalidität führen zu einem vermehrten Auftreten von Depression und einer erhöhten Suizidrate. Zwei Drittel der Patienten mit Multipler Sklerose versterben an krankheitsassoziierten Komplikationen meist infektiöser Genese [35].

2 Fragestellung

Das bullöse Pemphigoid (BP) ist die häufigste blasenbildende Autoimmundermatose und betrifft in erster Linie ältere Menschen [143]. Bei 30-50% der BP-Patienten kann eine Assoziation mit neurologischen Erkrankungen wie Demenz, Schlaganfällen, Morbus Parkinson, Multipler Sklerose und Epilepsie gefunden werden [3,19,29,37,94,96,168]. Dabei scheint die neurologische Erkrankung der Dermatose vorauszugehen [37,168].

Das BP ist durch Antikörper gegen zwei Strukturproteine der dermo-epidermalen Junktionszone, BP180 und BP230, gekennzeichnet [143]. Diese beiden Antigene weisen unterschiedliche Isoformen auf und können neben der Haut auch im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden [33,159].

Während Morbus Parkinson primär eine neurodegenerative Erkrankung ist, wird bei Multipler Sklerose angenommen, dass es bei der Krankheitsentstehung erst sekundär zu einer Beteiligung des ZNS mit neurodegenerativen Prozessen kommt [67,137]. Diese degenerativen Vorgänge könnten zur Demaskierung von BP180 und BP230 führen mit deren Exponierung gegenüber dem Immunsystem und Bildung von Anti-BP180- und BP230-Antikörpern [167].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu untersuchen, ob die Autoimmunantwort gegen BP180 und BP230 durch entzündliche und/oder degenerative Prozesse im ZNS ausgelöst wird. In diesem Sinne würden mehr Antikörper bei Patienten mit neurologischen Erkrankungen, in unserem Fall Morbus Parkinson und Multiple Sklerose, detektierbar sein im Vergleich zu den Kontrollen. Zur Prüfung der Hypothese wurden die Seren von Morbus Parkinson- und Multiple Sklerose-Patienten mit verschiedenen Testsystemen auf zirkulierende Antikörper gegen BP180 und BP230 sowie andere Proteine der dermo-epidermalen Junktionszone untersucht.

Sollte sich die Annahme bestätigen, könnte man bei betroffenen Patientengruppen ein Screening auf Serumantikörper gegen BP180 und BP230 durchführen, um eine frühzeitige Diagnose zu stellen und etwaige erforderliche Therapiemaßnahmen rasch einzuleiten.

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Untersucht wurden 175 Patientenseren, von denen 125 an Morbus Parkinson und 50 an Multipler Sklerose erkrankt waren. Als Kontrollen dienten 215 Patientenseren, von denen 140 keinen Anhalt für eine neurologische Erkrankung oder ein BP aufwiesen, sowie 75 Patienten, die an anderen neurologischen Erkrankungen [Apoplex, Rheuma, Essentieller Tremor, Progressive supranukleäre Paralyse, Alzheimer, Sarkoidose, Multisystematrophie, Epilepsie, Amyotrophe Lateralsklerose, Gangblockaden, Diffuse Lewy-Körper Erkrankung, Kortikobasale Degeneration, Morbus Bechterew, Polyneuropathie, Chorea Huntington, Drogen-induzierter Tremor, Dystonie, Fazialisparese, Tourette-Syndrom, Fokaler Anfall nach zerebraler Ischämie, Multiple Sklerose, Systemischer Lupus erythematodes, Normaldruckhydrozephalus, Restless legs Syndrom, Trigeminusneuralgie] litten (siehe Tab. 3.1).

225 Seren stammten aus dem Medizinischen Proteom Center Bochum. Sie waren einfach verblindet und setzten sich aus drei Gruppen mit jeweils 75 Seren zusammen, die alters- und geschlechtsentsprechend angepasst waren und immer zusammen untersucht wurden. Die erste Gruppe stammte von Morbus Parkinson-Patienten (Kohorte A1), die zweite von Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (Kohorte A2) und die dritte Gruppe bestand aus Seren gesunder Kontrollen (Kohorte A3). Es waren jeweils 35 Patienten weiblich und 40 männlich. Ihr Alter lag zwischen 40 und 79 Jahren, wobei der Durchschnitt bei 63,1 Jahren lag. Zwei Patienten waren über 80 Jahre alt. Nach der Blutentnahme wurden die Proben nach Zentrifugation und Portionierung bis zur Weiterverarbeitung bei -80˚C gelagert.

Das Alter der 50 Morbus Parkinson-Patienten (Kohorte C) aus der Neurologie des Universitätsklinikum Lübeck lag zwischen 42 und 82 Jahren mit einem Durchschnitt von 63,5 Jahren. 17 Patienten waren davon weiblichen Geschlechts und 29 dem männlichen zugehörig. Bei vier Patienten lagen uns keine Angaben zum Geschlecht vor, bei zwei von diesen Patienten fehlte zudem die Altersangabe. Nach der Blutentnahme wurden die Proben nach Zentrifugation und Portionierung bis zur Weiterverarbeitung bei -20˚C gelagert.

Die 50 Multiple Sklerose Patienten (Kohorte D) wiesen ein Alter zwischen 20 und 53 Jahren auf mit einem Durchschnittsalter von 33,0 Jahren, wobei die Altersangaben von drei Patienten nicht vorlagen. 15 Patienten waren davon männlich, 35 weiblich. Die Seren dieser Patienten erhielten wir ebenfalls von dem Medizinischen Proteom Center Bochum.

Die weiteren 65 Seren, die als Kontrollen dienten, stammten aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck von Patienten über 75 Jahre mit nicht-entzündlichen Dermatosen (z.B. Plattenepithelkarzinom, Basalzellkarzinom) (Kohorte

B). Sie setzten sich aus 38 weiblichen, sowie 27 männlichen Patienten zusammen. Ihr Alter lag zwischen 75 und 92 mit einem Durchschnittsalter von 81,6 Jahren. Nach der Blutentnahme wurden die Proben zentrifugiert und portioniert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20˚C gelagert.

Die Kohorten B, C und D waren nicht alters- oder geschlechtsentsprechend angepasst, das Alter der Kohorte B entsprach aber der typischen Altersgruppe von BP-Patienten.

Tab. 3.1: Diagnosen der Kohorte A2 (n=75)

Diagnose	n	%
Apoplex	8	11,1
Rheuma	2	9,7
Multiple Sklerose	6	8,3
Essentieller Tremor	6	8,3
Progressive supranukleäre Paralyse	6	8,3
Alzheimer	4	5,6
Sarkoidose	4	5,6
Multisystematrophie	4	5.6
Epilepsie	2	2,8
Amyotrophe Lateralsklerose	2	2,8
Gangblockaden	2	2,8
Diffuse Lewy-Körper Erkrankung	2	2,8
Kortikobasale Degeneration	2	2,8
Morbus Bechterew	2	2,8
Polyneuropathie	3	4,2
Chorea Huntington	1	4,2
Drogen-induzierter Tremor	2	2,8
Dystonie	1	1,4
Fazialisparese	1	1,4
Tourette Syndrom	1	1,4
Fokaler Anfall nach zerebraler Ischämie	1	1,4
Systemischer Lupus Erythematodes	1	1,4
Normaldruckhydrozephalus	1	1,4
Restless legs Syndrom	1	1,4
Trigeminusneuralgie	1	1,4

n=Anzahl

Tab. 3.2: Demographische Daten der verschiedenen Kohorten

	Kohorte	n	Geschlecht		Durchschnittsalter (in Jahren)	Herkunft
			m	w		
Morbus Parkinson	A1	75	40	35	63,1	MPC Bochum
	C	50	29[1]	17[1]	63,5[2]	UKSH Lübeck
Anders neurologisch Erkrankte	A2	75	40	35	63,1	MPC Bochum
Multiple Sklerose	D	50	15	35	33,0[3]	MPC Bochum
Kontrollen	A3	75	40	35	63,1	MPC Bochum
	B	65	27	38	81,6	UKSH Lübeck

n= Anzahl; m=männlich; w=weiblich; UKSH=Universitätsklinikum Schleswig-Holstein; MPC=Medizinisches Proteom Center

[1] Geschlechtsangabe von 4 Patienten unbekannt

[2] Altersangaben von 2 Patienten unbekannt

[3] Altersangaben von 3 Patienten unbekannt

3.2 Negativkontrollen

Als Negativkontrollen wurden Seren von gesunden Blutspendern verwendet.

3.3 Ethikvotum

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck am 14.02.2011 positiv begutachtet (Nr.: 10-229).

3.4 Antikörper

Tab 3.3: Verwendete Antikörper im Westernblot

Bezeichnung	Typ	Verdünnung	Funktion
Anti-Laminin α-3 (H-187) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)	Polyklonales Kaninchen IgG	1:10.000	Primärer AK
Anti-LAMA3 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)	Polyklonales Kaninchen, C-terminaler Antikörper	1:10.000	Primärer AK
Anti-Laminin β-3 Antikörper (H-300) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)	Polyklonales Kaninchen IgG	1:100.000	Primärer AK
Anti-Laminin γ-2 Antikörper (E6) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)	Monoklonales Maus IgG_1	1:100.000	Primärer AK
NHS, PK, Patient	Patientenserum	1:50	Primärer AK
Anti-Kaninchen (Dako, Hamburg)	Polyklonales Ziege-Anti-Kaninchen IgG-HRP	1:10.000	Sekundärer AK
Anti-Maus (Dako, Hamburg)	Polyklonales Kaninchen-Anti-Maus IgG-HRP	1:10.000	Sekundärer AK
Anti-Human (Southern Biotech, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching)	Maus-Anti-Human IgG_4-HRP (Clone HP 6025)	1:10.000	Sekundärer AK

ECM= extrazelluläre Matrix; AK= Antikörper; LAMA3= Laminin α-3; NHS= normales humanes Serum; PK= Positivkontrolle; HRP= Horseradish-Meerrettichperoxidase

Tab. 3.4: Verwendete Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenz

Bezeichnung	Typ	Verdünnung	Funktion
NHS, PK, Patient	Patientenserum	1:10	Primärer AK
NaCl-separierte Spalthaut: Anti-Human (Bio-Rad, München)	Sheep-Anti-Human IgG-FITC	1:100	Sekundärer AK
Affenösophagus: Anti-Human (Binding Site, Birmingham, UK)	Anti-Human IgG-AFF-FITC	1:100	Sekundärer AK

NHS= normales humanes Serum; PK= Positivkontrolle; AK= Antikörper; NaCl= Natriumchlorid; FITC= Fluorescein Isothiocyanate

3.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für den Nachweis von IgG-Antikörpern gegen BP180-NC16a und BP230 wurden ELISA durchgeführt nach Angaben des Herstellers (Euroimmun, Lübeck) [16,161].

Da es sich bei der Untersuchung um eine quantitative Analyse handelte, kamen drei Kalibratoren zum Einsatz. Diese, eine Positiv- und Negativkontrolle sowie die Patientenseren, die 1:101 mit Probenpuffer verdünnt wurden, wurden in die einzelnen mit dem jeweiligen Antigen beschichteten Reagenzgefäße der Miktrotitierplatte pipettiert. Die Proben-Inkubation dauerte 30 Minuten und fand bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurden die Reagenzgefäße dreimal mit jeweils 300µl eines 1:10 verdünnten Waschpuffers (in Aqua dest.) gewaschen. Im nächsten Schritt fand die Inkubation mit Enzymkonjugat-Lösung (Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgG) für 30 Minuten bei Raumtemperatur statt. Der Waschvorgang wurde wiederholt. Anschließend wurde Chromogen/Substrat-Lösung in die Reagenzgefäße pipettiert. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Stopplösung in derselben Reihenfolge und Geschwindigkeit wie die vorherige Lösung pipettiert, sodass die photometrische Auswertung der Farbintensität bei 450 nm Messwellenlänge im ELISA Reader erfolgen konnte.

3.6 Westernblot

Der Westernblot ist ein Verfahren zur qualitativen in-vitro Bestimmung humaner Antikörper ($IgG_{4)}$ gegen einzelne Ketten von Laminin 332 (α3, β3, γ2) in extrazellulärer Matrix kultivierter Keratinozyten [99]. Dafür binden im ersten Reaktionsschritt Anti-α3-Antikörper, Anti-β3-Antikörper und Anti-γ2-Antikörper mit den jeweiligen Zielantigenen in der Nitrozellulosemembran. Um diese gebundenen Antikörper darzustellen, wird anschließend eine Inkubation mit einem Enzym-markierten Anti-Human-IgG_4-Antikörper durchgeführt, der nachfolgend eine Farbreaktion katalysiert. Die extrazelluläre Matrix kultivierter Keratinozyten enthält zudem auch BP180 und BP230. BP180 liegt in der 180kDa full-length Form sowie in der 120kDa schweren löslichen Ektodomäne vor. BP230 ist als 230kDa schwere Kollagenproteine enthalten.

Zur Testung der Seren auf Anti-Laminin 332-Reaktivität wurde die Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) durchgeführt. Dafür wurden ein Extrakt der extrazellulären Matrix kultivierter HaCaT-Keratinozyten und Glycerolgele verwendet.
Für die Gele kamen zwei verschiedene Zusammensetzungen zur Anwendung:

Tab. 3.5: Zusammensetzungen der Gele

	Sammelgel 4%	**Trenngel 7,5%**	**Herkunft**
Aqua dest.	3,1 ml	4,15 ml	Apotheke UKSH
0,5M Tris pH 6,8	700 µl		
1,5M Tris pH 8,8		1,35 ml	
30% Acrylamid-bis (49:1)	650 µl	2,5 ml	Appli Chem
100% Glycerol	250 µl	500 µl	Appli Chem
0,5M EDTA pH 8,0	40 µl		Roth
1M Glycin		1 ml	Roth
10% SDS	200 µl	400 µl	Merck
Temed	12 µl	12 µl	Roth
10% APS	100 µl	150 µl	Sigma

Aqua dest. = Aqua destillata; EDTA= Ethylendiamintetraacetat; SDS= Sodium-Dodecylsulfat; APS=Ammonium Persulfate

Die hergestellten Gele wurden in die Elektrophoresevorrichtung eingespannt und mit dem Extrakt und den Proteinmarkern beladen, um anschließend die Vorrichtung mit Laufpuffer, bestehend aus Tris-Base, Glycin, SDS und Aqua dest., aufzufüllen. Die Elektrophorese erfolgte bei 50mA und 150V bei Raumtemperatur innerhalb von zwei Stunden. Anschließend

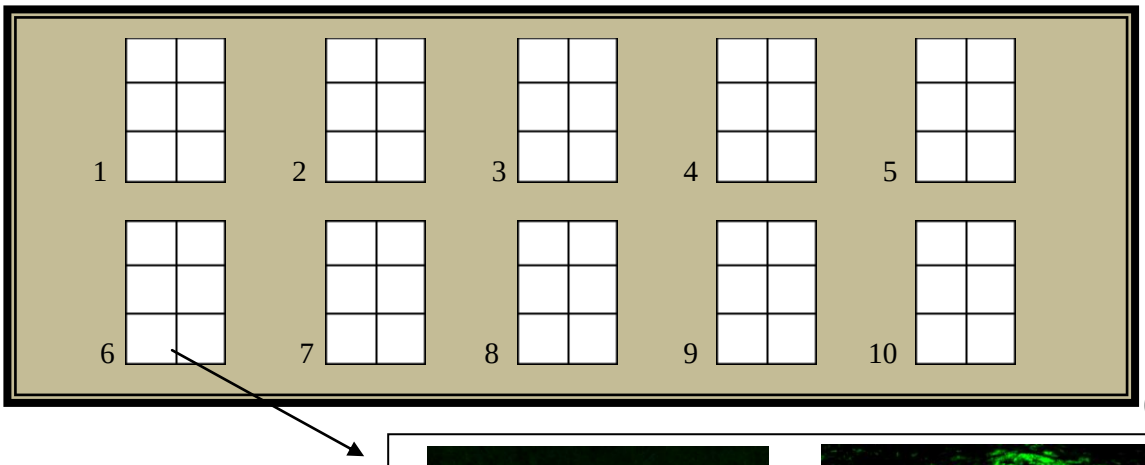
wurde der Proteintransfer von den Gelen auf Nitrozellulosen vorbereitet, indem nach einem festgelegten Schema Trenngele, Nitrozellulosen, Wattmanpapier und Faserkissen in spezielle Kassetten eingelegt und in Transferpuffer, zusammensetzend aus Tris, Glycin, Aqua dest. und Methanol, gestellt wurden. Der Transfer erfolgte bei 120V und 3mA bei 4˚C innerhalb einer Stunde. Nach erfolgreich abgeschlossenem Transfer ließ sich dieser durch Anfärben der Nitrozellulosen mit einer Lösung bestehend aus Fast Green, Methanol, Essigsäure und Aqua dest. kontrollieren.

Für die Durchführung des Westernblots wurde die Nitrozellulosemembran in Streifen geschnitten und in Blockingpuffer, bestehend aus Magermilchpulver in Tris-buffered saline plus tween puffer (TBST), für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Anschließend fand die Inkubation der Streifen mit den Patientenseren bei 4˚C etwa 18 Stunden lang statt, die 1:50 in Inkubationspuffer (1% Bovines Serumalbumin in TBST) verdünnt wurden. Die Nitrozellulosestreifen wurden im Anschluss 30 Minuten in TBST gewaschen und danach wurde der Sekundärantikörper, 1:10.000 verdünnt, in Inkubationspuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Streifen gegeben. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die Streifen auf einer Folie fixiert und darauf das 1:1 Reagenzgemisch aus den Enhanced Chemiluminescence Lösungen pipettiert und für 5 Minuten inkubiert. Die Antigen-Antikörperreaktionen zwischen Extrakt und Primärseren ließen sich nun mithilfe der HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in der Dunkelkammer auf Röntgenfilmen darstellen.

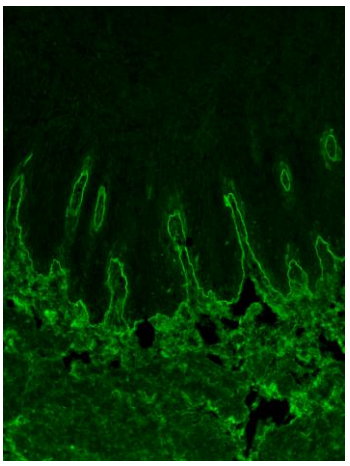
3.7 BIOCHIP®-Mosaik

Beim BIOCHIP®-Mosaik handelt es sich um ein Testsystem, das nach dem Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz funktioniert. Es ist gleichzeitig ein Such- und Differenzierungstest, da es aus sechs verschiedenen Substraten besteht, die zum Nachweis humaner hautspezifischer Antikörper im Serum dienen. Der verwendete BIOCHIP®-Mosaik umfasste zehn Testfelder, sodass 10 Seren simultan untersucht werden konnten. Als Substrate wurden Affenösophagus, 1M NaCl-separierte humane Spalthaut, aufgereinigtes rekombinantes BP180-NC16a-Tetramer-Peptid und HEK293-Zellen, die jeweils mit dem rekombinantem C-Terminus von BP230 (BP230 globuläre C-Domäne), der gesamten BP230-Domäne (BP230 full-length) und der gesamten BP180-Domäne (BP180 full-length) transfiziert wurden, verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Euroimmun, Lübeck).

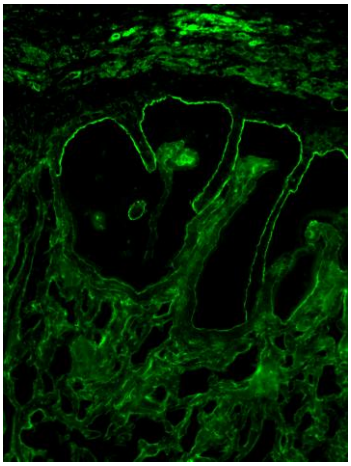
Mit Hilfe eines Reagenzträgers auf den die 1:10 verdünnten Proben pipettiert und der Objektträger dann gelegt wurde, wurde sichergestellt, dass alle Felder des BIOCHIP®-Mosaiks gleichzeitig in Kontakt mit den Proben kamen und so alle Reaktionen gleichzeitig gestartet werden konnten. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Objektträger 5 Minuten mit PBS-Tween gewaschen. Anschließend wurde wieder mit Hilfe des Reagenzträgers der BIOCHIP®-Mosaik mit Fluorescein-markiertem Anti-Human-IgG in Kontakt gebracht und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschvorgang wurde nach der Inkubation wiederholt. Nun wurde Glycerol als Eindeckmedium auf die einzelnen Felder getropft und mit einem Deckglas belegt. Anschließend konnte die Auswertung der Fluoreszenz mit dem Mikroskop (Carl Zeiss) erfolgen.



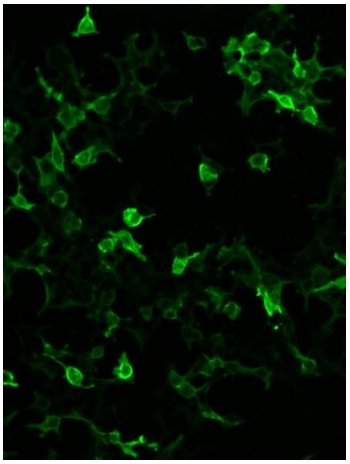
(a)



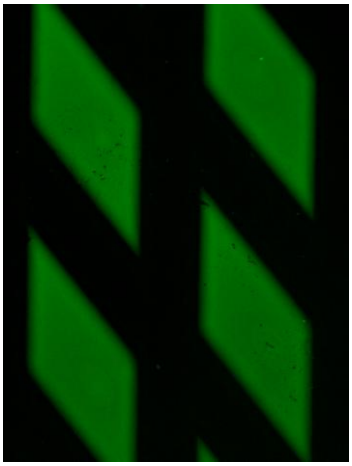
(b)



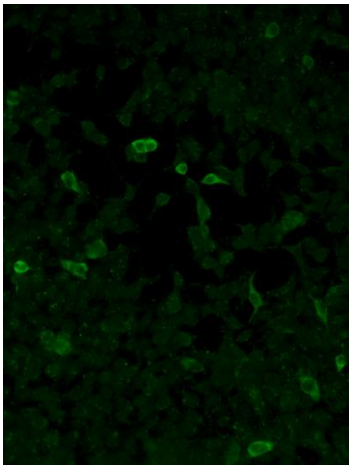
(c)



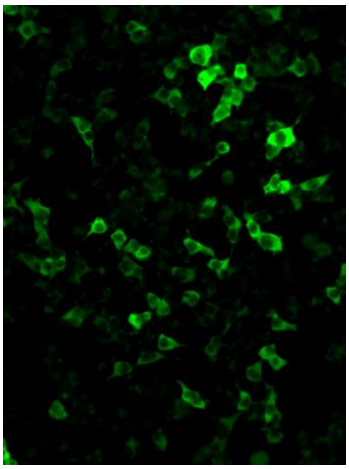
(d)



(e)



(f)



(g)

Abb. 3.1 BIOCHIP®-Mosaik

(a) Exemplarische Darstellung eines BIOCHIP®-Mosaiks. Zehn Inkubationsfelder mit je sechs verschiedenen Substraten befinden sich auf diesem BIOCHIP®-Mosaik. So lassen sich mehrere Seren gleichzeitig auf Autoantikörper testen. Die Auswertung der Fluoreszenzreaktivität erfolgt am Mikroskop. Auf dem verwendeten und hier dargestellten BIOCHIP®-Mosaik wurden als Substrate Affenösophagus mit positiver Basalmembranfluoreszenz (b), 1 M NaCl-separierte humane Spalthaut mit Bindung der Antikörper am Blasendach (c), BP180 full-length (d), BP180-NC16a (e), BP230 full-length (f) und BP230 globuläre C-Domäne (g) benutzt. Das getestete Serum stammt von einem BP-Patienten, dementsprechend zeigen alle Felder eine positive Reaktion.

3.8 Indirekte Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut und Affenösophagus

Die indirekte Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut und Affenösophagus dient zur Detektion zirkulierender Antikörper gegen Antigene der dermo-epidermalen Junktionszone bei Patienten mit bullösen Autoimmundermatosen. Für den Nachweis müssen die im Serum des Patienten enthaltenden Antikörper an das Blasendach oder den Blasenboden der 1M NaCl-separierten Spalthaut oder an die Basalmembran des Affenösophagus binden, damit die Fluoreszein-Isothiocyanat-markierten Sekundärantikörper (FITC) schließlich zum Sichtbarmachen der Reaktion führen. Aus der durch 1M NaCl-separierten Spalthaut und dem Affenösophagus wurden Gefrierschnitte angefertigt. Die Substrate wurden in der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck hergestellt. Die Spalthaut wurde aus der Anatomie der Universität zu Lübeck bezogen und der Affenösophagus stammte aus dem Primatenzentrum Göttingen, sodass sich die Substrate von denen, die im BIOCHIP®-Mosaik verwendet wurden, unterschieden. Als Sekundärantikörper kamen IgG-Antikörper zum Einsatz.

Die Patientenseren sowie eine Positiv- und Negativkontrolle wurden 1:10 in PBS verdünnt und auf die Substrate pipettiert, um anschließend 30 Minuten in feuchter Kammer im Brutschrank bei 37˚C zu inkubieren. Die Objektträger wurden danach mit PBS zweimal 10 Minuten gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper inkubiert wie oben beschrieben. Für die Spalthaut wurde der Antikörper Sheep-Anti-Human IgG-FITC, für den Affenösophagus Anti-Human IgG-AFF-FITC verwendet. Der Waschvorgang wurde nach der Inkubation wiederholt. Die Objektträger wurden vorsichtig abgetrocknet, mit Glyceringelatine 1:5 eingedeckt und konnten am Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden.

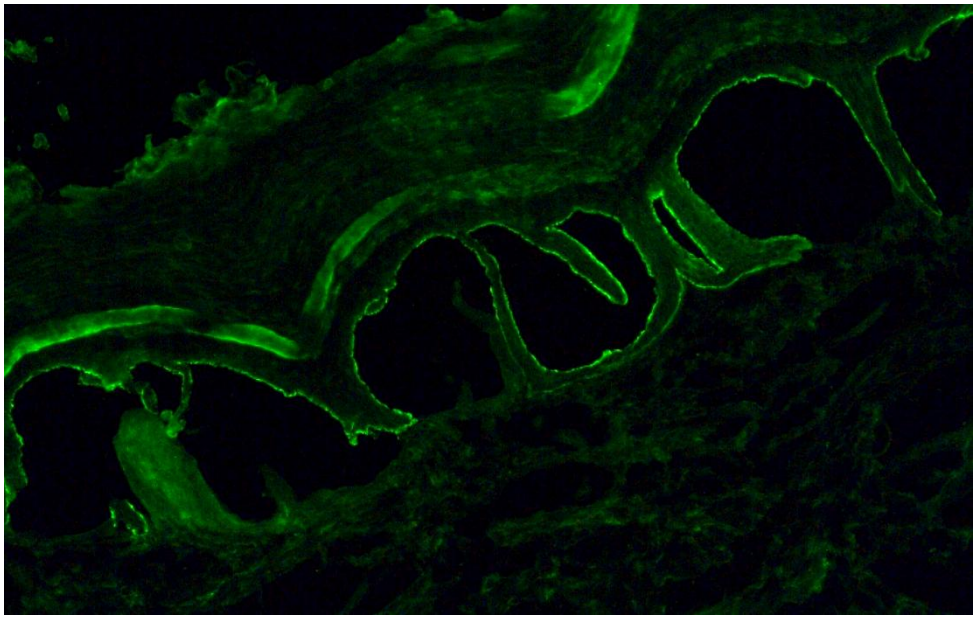


Abb. 3.2 Indirekte Immunfluoreszenz auf humaner 1M NaCl-separierter Spalthaut
Beim bullösen Pemphigoid binden die Antikörper gegen BP180 und BP230 typischerweise am Dach des artifiziellen Spaltes.

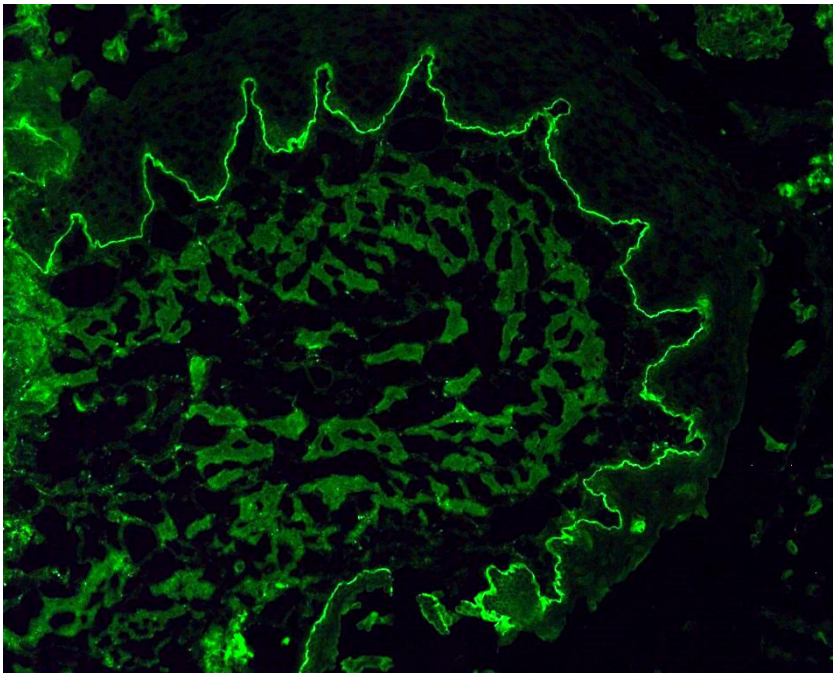


Abb. 3.3 Indirekte Immunfluoreszenz auf Affenösophagus

Beim bullösen Pemphigoid binden die Antikörper gegen BP180 und BP230 typischerweise an die Basalmembran des Affenösophagus.

3.9 Statistik

Für die statistische Analyse wurde die Software „Gnu R“ Version 3.15 (URL: http://www.r-projekt.org) verwendet zusammen mit *clinfun* für die Powerkalkulationen und *epitools* für die Berechnung des Wilson-Konfidenzintervalls. Für die Bestimmung der benötigten Kohortengrößen, um die Anzahl positiver Seren zwischen Patienten und Kontrollen zu vergleichen, wurde eine Powerkalkulation basierend auf dem Fischer’s Exact Test durchgeführt. Dafür nahmen wir an, dass die Wahrscheinlichkeit Serumantikörper bei Morbus Parkinson- und Multiple Sklerose-Patienten im Vergleich zu Kontrollen zu finden mindestens fünffach erhöht sein sollte und dass Anti-BP180- und BP230-Antikörper bei 1-2% der Kontrollen nachweisbar sein würden [16,127,170]. Unter diesen Annahmen wurde die Power für den Nachweis einer signifikant unterschiedlichen Anzahl von BP180- und BP230-positiven Seren zwischen Morbus Parkinson- und Multiple Sklerose-Patienten (n=175) und Kontrollen (n=215) mit π = 0,51-0,86 berechnet. P-Werte unter einem Grenzwert von 0,05 wurden als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Darstellung der Ergebnisse nach Testverfahren

4.1.1 ELISA

Testung der Seren der Morbus Parkinson-Patienten (n=125) auf IgG-Antikörper gegen BP180 im ELISA

Die Seren der Morbus Parkinson-Patienten (n=125) wurden auf IgG-Reaktivität gegen BP180-NC16a getestet. Ein Serum (0,8%) wies ein positives Ergebnis auf. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.1 dargestellt. Tabelle 4.1 gibt die Höhe des positiven Serums wieder.

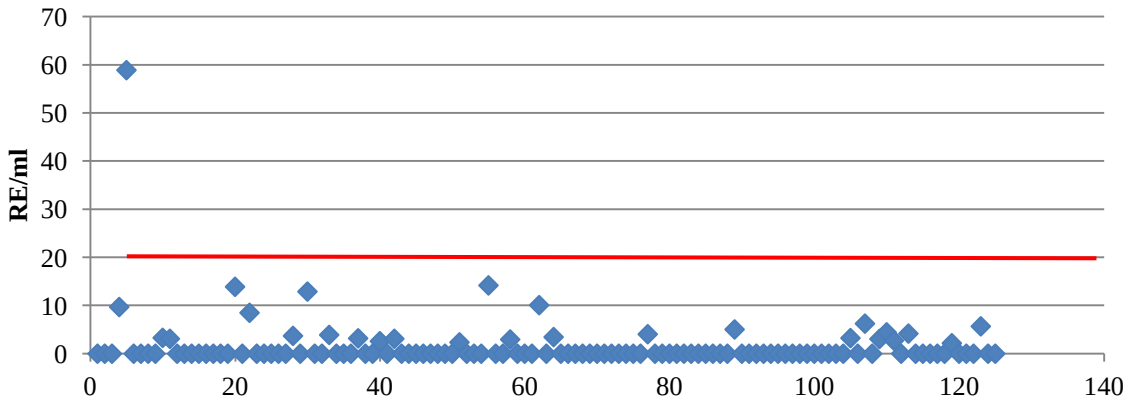


Abb. 4.1: Testung der 125 Seren der Morbus Parkinson-Patienten auf Antikörper gegen BP180-NC16a im ELISA. Die rote Linie zeigt den Cut-off bei ≥20 RE/ml für ein positives Ergebnis an. Ein Serum liegt über dieser Grenze.

Tab. 4.1: **Höhe des positiv getesteten Serums des Morbus Parkinson-Patienten im Anti-BP180-4X-ELISA**

Serum-Nr.	RE/ml
N5	58,9

Der Cut-off liegt bei ≥20 RE/ml.

Testung der Seren der Morbus Parkinson-Patienten (n=125) auf IgG-Antikörper gegen BP230 im ELISA

Die Seren der Morbus Parkinson-Patienten (n=125) wurden auf IgG-Reaktivität gegen BP230 getestet. Zwei Seren (1,6%) wiesen ein positives Ergebnis auf. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2 dargestellt. Tabelle 4.2 gibt die Höhe der positiven Seren wieder.

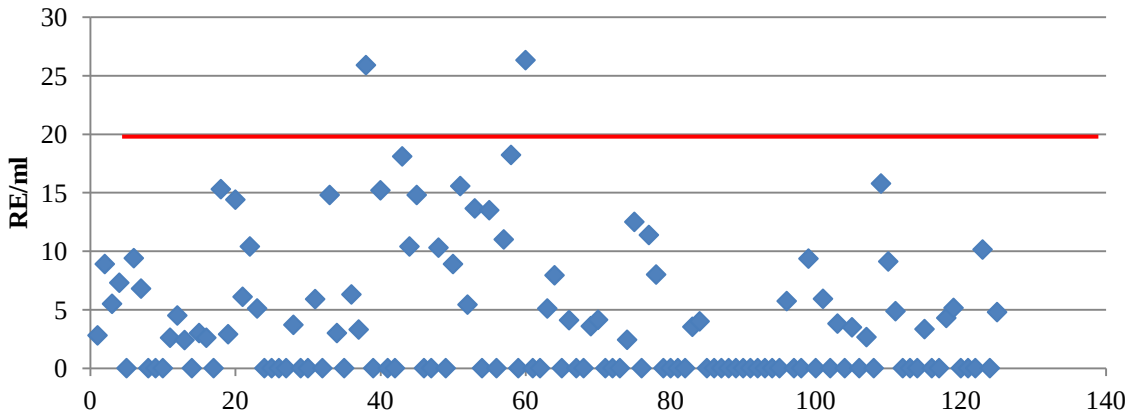


Abb. 4.2: Testung der 125 Seren der Morbus Parkinson-Patienten auf Antikörper gegen BP230 im ELISA. Die rote Linie zeigt den Cut-off bei ≥20 RE/ml für ein positives Ergebnis an. Zwei Seren liegen über dieser Grenze.

Tab. 4.2: Höhe der positiv getesteten Seren der Morbus Parkinson-Patienten im Anti-BP230-CF-ELISA

Serum-Nr.	RE/ml
N38	25,9
11/071	26,3

Der Cut-off liegt bei ≥20 RE/ml.

Testung der Seren der Multiple Sklerose-Patienten auf IgG-Antikörper gegen BP180 und BP230 im ELISA

Für die Seren der Multiple Sklerose-Patienten (n=50) konnte weder im Anti-BP180-NC16A-4X-ELISA noch im Anti-BP230-CF-ELISA IgG-Reaktivität nachgewiesen werden.

Testung der Seren der anders neurologisch erkrankten Patienten auf IgG-Antikörper gegen BP180 im ELISA

Die Seren der anders neurologisch erkrankten Patienten (n=75) wurden auf IgG-Reaktivität gegen BP180-NC16a getestet. Vier Seren (5,3%) wiesen ein positives Ergebnis auf. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Tabelle 4.3 gibt die Höhe der positiven Seren wieder.

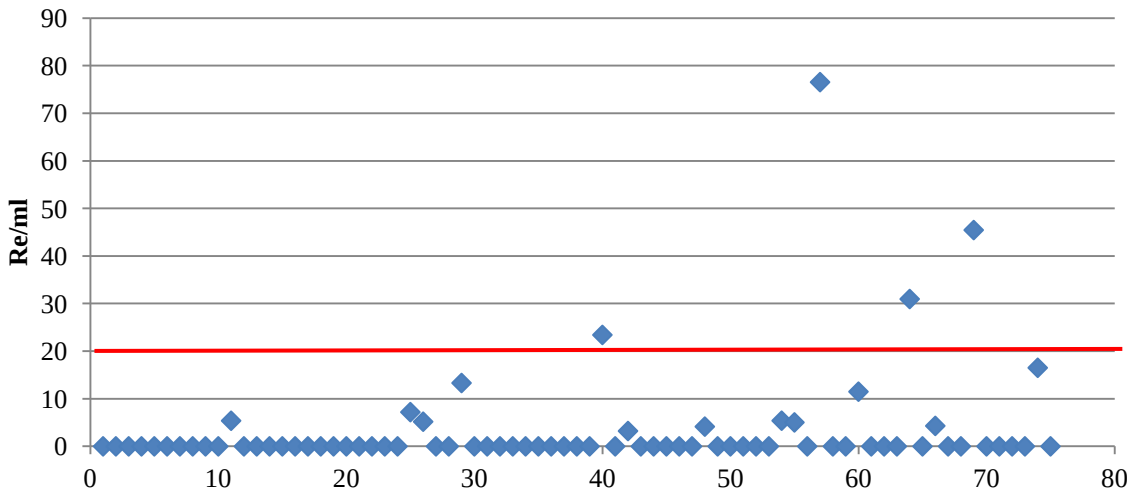


Abb. 4.3: Testung der 75 Seren der anders neurologisch erkrankten Patienen auf Antikörper gegen BP180-NC16a im ELISA. Die rote Linie zeigt den Cut-off bei ≥20 RE/ml für ein positives Ergebnis an. Vier Seren liegen darüber.

Tab. 4.3: Höhe der positiv getesteten Seren der anders neurologisch erkrankten Patienten im Anti-BP180-NC16A-4X-ELISA

Serum-Nr.	RE/ml
41/105	23,4
59/144	76,5
66/221	30,9
71/227	45,5

Der Cut-off liegt bei ≥20 RE/ml.

Testung der anders neurologisch erkrankten Patientenseren auf IgG-Antikörper gegen BP230 im ELISA

Bei Testung der Seren der anders neurologisch erkrankten Patienten (n=75) auf Antikörper gegen BP230 wurden alle Seren negativ getestet.

Testung der Kontrollseren auf IgG-Antikörper gegen BP180 im ELISA

Die Kontrollseren (n=140) wurden auf IgG-Reaktivität gegen BP180-NC16a getestet. Zwei Seren (1,4%) wiesen ein positives Ergebnis auf. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Tabelle 4.4 gibt die Höhe der positiven Seren wieder.

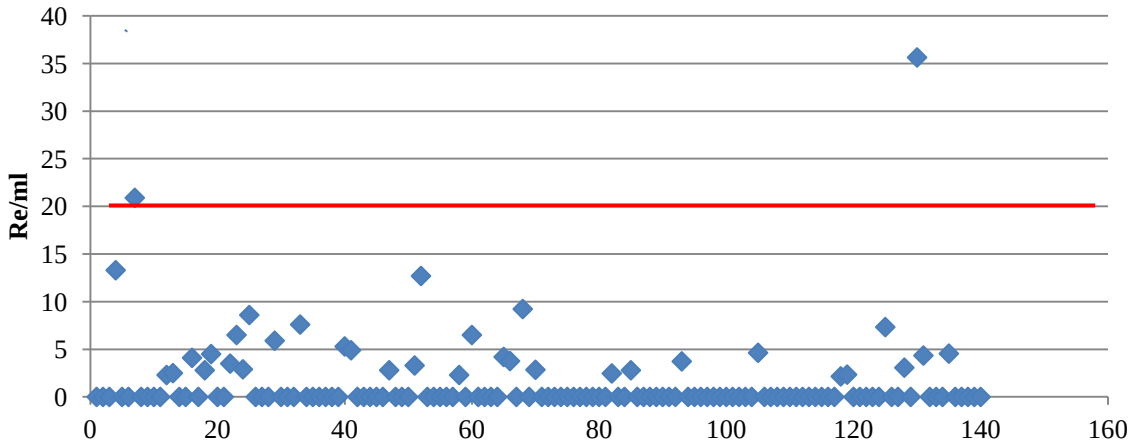


Abb. 4.4: Testung der 140 Kontrollseren auf Antikörper gegen BP180-NC16a im ELISA. Die rote Linie zeigt den Cut-off für ein positives Ergebnis bei ≥20 RE/ml an. Zwei Seren liegen darüber.

Tab. 4.4: Höhe der positiv getesteten Kontrollseren im Anti-BP180-NC16A-4X-ELISA

Serum-Nr.	RE/ml
A7	20,9
67/284	35,6

Der Cut-off liegt bei ≥20 RE/ml.

Testung der Kontrollseren auf IgG-Antikörper gegen BP230 im ELISA

Die Kontrollseren (n=140) wurden auf IgG-Reaktivität gegen BP230 getestet. Sieben Seren (5%) wiesen ein positives Ergebnis auf. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.5 dargestellt. Tabelle 4.5 gibt die Höhe der positiven Seren wieder.

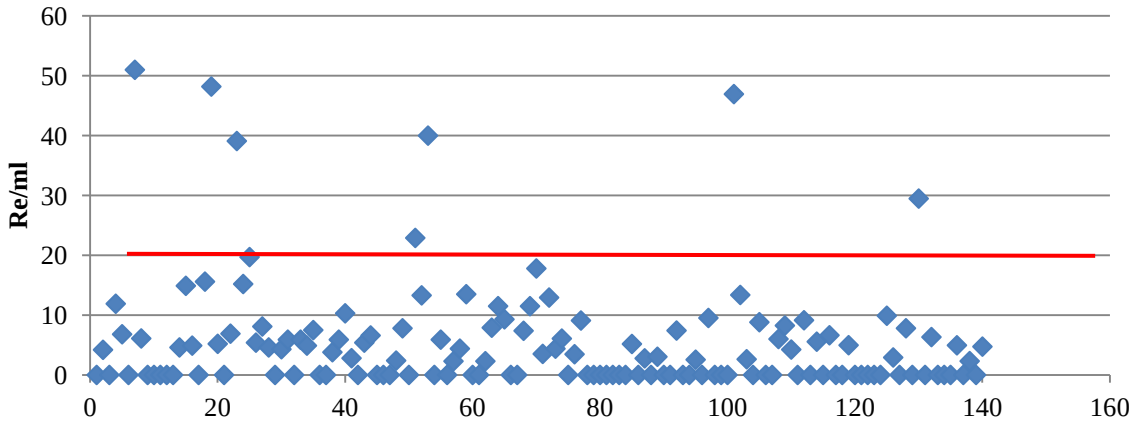


Abb. 4.5: Testung der 140 Kontrollseren auf Antikörper gegen BP230 mittels Anti-BP230-CF-ELISA. Die rote Linie zeigt den Cut-off bei ≥20 RE/ml für ein positives Ergebnis an. Sieben Seren liegen darüber.

Tab. 4.5: Höhe der positiv getesteten Kontrollseren im Anti-BP230-CF-ELISA

Serum-Nr.	RE/ml
A7	51,0
A19	48,2
A23	39,1
A51	22,9
A53	40,0
37/128	46,9
67/284	29,5

Der Cut-off liegt bei ≥20 RE/ml.

4.1.2 Westernblot

Testung der Seren auf IgG$_4$-Reaktivität gegen Laminin 332 mit extrazellulärer Matrix (ECM)

Alle Seren (n=390) wurden im Westernblot mit Hilfe des IgG$_4$-Antikörpers auf verschiedene Ketten von Laminin 332 (200kDa schwere, nicht-prozessierte α3-Kette, 165kDa schwere, prozessierte α3-Kette, 140kDa schwere, nicht-prozessierte β3-Kette, 155kDa schwere, nicht-prozessierte γ2-Kette und 105kDa schwere, prozessierte γ2-Kette) getestet.

Keines der Seren zeigte Reaktivität gegen jegliche Ketten von Laminin 332 sowie gegen BP180 und BP230.

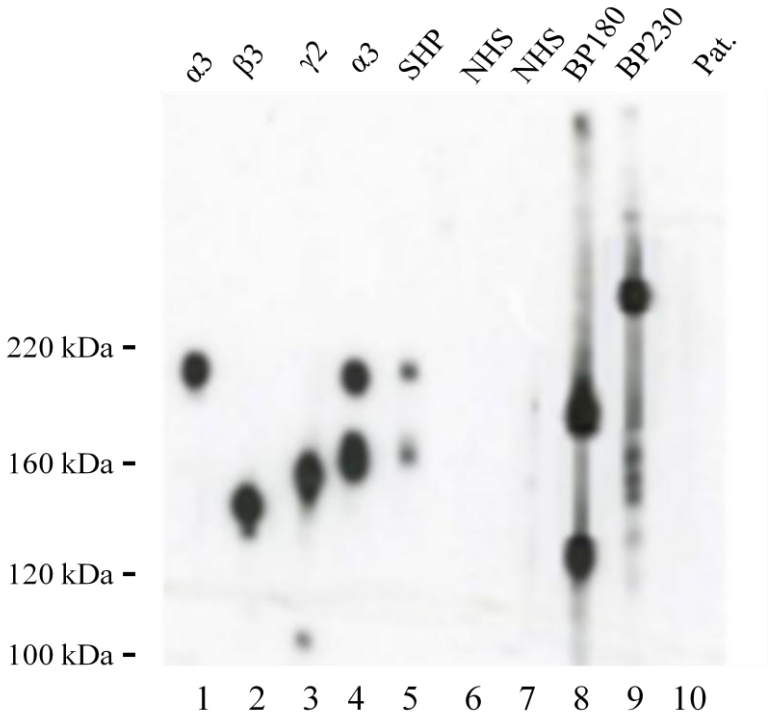


Abb. 4.6 Westernblot mit extrazellulärer Matrix

Die Streifen 1-5 sind Positivkontrollen (PK) mit 1 = Laminin α3, 2 = Laminin β3, 3 = Laminin γ2, 4 = Laminin α3, 5 = Schleimhautpemphigoid (SHP) 1:1600 verdünnt, 6 und 7 = negativ humanes Serum (NHS), 8 = PK BP180, 9 = PK BP230, 10 = Patientenserum (Pat.). Die Negativkontrollen und das Patientenserum zeigen weder eine spezifische Immunreaktion gegen einzelne oder mehrere Ketten von Laminin 332 noch gegen BP180 oder BP230. Die Ergebnisse sind exemplarisch dargestellt. Die Stärke der Banden wurde durch Variation der Zeit austariert. Links neben der Abbildung finden sich die Positionen der Molekulargewichtsmarker.

4.1.3 BIOCHIP®-Mosaik

Alle Seren (n=390) wurden mit dem BIOCHIP®-Mosaik auf den sechs verschiedenen Substraten (1M NaCl-separierte humane Spalthaut, Affenösophagus, BP180-NC16a, BP180 full-length, BP230-globuläre C-Domäne und BP230 full-length) analysiert. Die Testfelder wurden nach der Fluoreszenzreaktivität mikroskopisch ausgewertet.

Tab. 4.6: Ergebnisse im BIOCHIP®-Mosaik

	Gesamt n (%)	Substrate					
		BP180 NC16a	BP180 fl	BP230 gC	BP230 fl	Spalt-haut	Öso-phagus
Kontrollen	3 (2,1%)	-	1	-	1	1	-
Morbus Parkinson	1 (0,8%)	-	1	-	-	-	-
Anders neurologisch Erkrankte	3 (4,0%)	1	1	-	1	-	-
Multiple Sklerose	0 (0%)	-	-	-	-	-	-

n=Anzahl; fl= full-length, gC= globuläre C-Domäne

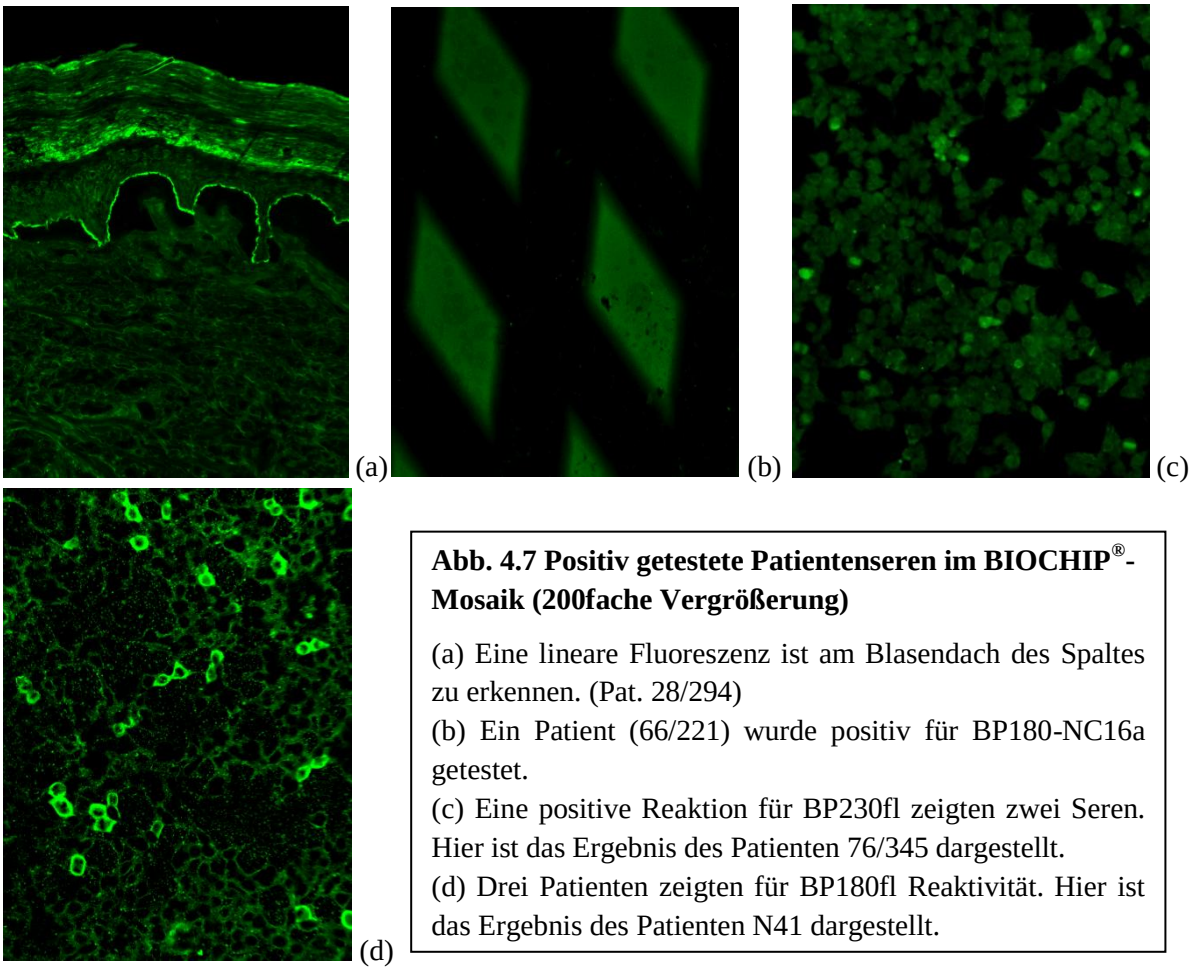


Abb. 4.7 Positiv getestete Patientenseren im BIOCHIP®-Mosaik (200fache Vergrößerung)

(a) Eine lineare Fluoreszenz ist am Blasendach des Spaltes zu erkennen. (Pat. 28/294)
(b) Ein Patient (66/221) wurde positiv für BP180-NC16a getestet.
(c) Eine positive Reaktion für BP230fl zeigten zwei Seren. Hier ist das Ergebnis des Patienten 76/345 dargestellt.
(d) Drei Patienten zeigten für BP180fl Reaktivität. Hier ist das Ergebnis des Patienten N41 dargestellt.

4.1.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Indirekte Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut und IgG als Sekundärantikörper

Es wurden die Seren (n=20) getestet, die in mindestens einer der vorangegangenen Untersuchungen positiv waren. Ein Serum wurde getestet, das im Westernblot unklare Banden zeigte, die jedoch nicht reproduzierbar waren. Die Auswertung erfolgte nach Bindung der Antikörper am Blasendach und Darstellung der Fluoreszenz. Aus der alters- und geschlechtsentsprechend angepassten Kontrollgruppe (Kohorte A3) konnte ein Serum (28/294) positiv getestet werden (0,7%).

Indirekte Immunfluoreszenz auf Affenösophagus und IgG als Sekundärantikörper

Getestet wurden all die Seren (n=20), die in den vorangegangen Untersuchungen mindestens ein positives Ergebnis aufwiesen. Ein Serum wurde getestet, das im Westernblot unklare Banden zeigte, die jedoch nicht reproduzierbar waren. Die Auswertung der Substrat-Schnitte erfolgte mikroskopisch nach positiver Basalmembranfluoreszenz. Insgesamt wurden drei Seren (A7, A53, A64) positiv getestet (2,1%). Allesamt stammten aus der Kohorte B, also der Kontrollgruppe der Patienten über 75 Jahre ohne Anhalt für entzündliche Dermatosen.

4.2 Darstellung der Ergebnisse nach Gruppen

4.2.1 Morbus Parkinson

In der Gruppe der Morbus Parkinson-Patienten wurden insgesamt vier Patienten positiv getestet in mindestens einem Untersuchungsverfahren. Ein Patient (N5) lag im BP180-ELISA über dem Cut-off für ein positives Ergebnis und zwei Patienten (N38, 11/071) wiesen im BP230-ELISA ein positives Ergebnis auf. Zudem konnte bei einem Patienten (N41) im BIOCHIP®-Mosaik für BP180 full-length (fl) Fluoreszenzreaktivität nachgewiesen werden. In der indirekten Immunfluoreszenz wurden die positiven Seren auf humaner Spalthaut und Affenösophagus untersucht, wobei alle Seren ein negatives Ergebnis aufwiesen.

4.2.2 Anders neurologisch Erkrankte

Bei den anders neurologisch erkrankten Patienten wurden insgesamt sechs Seren positiv getestet. Vier Patienten (41/105, 59/144, 66/221, 71/227) lagen im BP180-ELISA über dem Cut-off von 20 RE/ml, wobei ein Patient (66/221) auch im BIOCHIP®-Mosaik bei dem BP180-NC16a-Feld Reaktivität zeigte. Bei einem anderen Patienten (69/234) ließ sich im BIOCHIP®-Mosaik bei dem BP180fl-Substrat Fluoreszenzreaktivität detektieren. Im Feld für BP230fl konnten bei einem weiteren Patienten Antikörper nachgewiesen werden. In der indirekten Immunfluoreszenz konnte keines der positiven Ergebnisse bestätigt werden.

4.2.3 Multiple Sklerose

Alle Seren der Multiple Sklerose-Patienten wiesen in sämtlichen Untersuchungen ein negatives Ergebnis auf.

4.2.4 Kontrollen

Unter den Kontrollen fanden sich insgesamt elf positive Seren. Zwei Seren (A7, 67/284) lagen im BP180-ELISA über dem Cut-off für ein positives Ergebnis und sieben Seren (A7, A19, A23, A51, A53, 37/128, 67/284) im BP230-ELISA. Bei einem Patienten (A7) wurden die positiven Ergebnisse aus dem BP180- und BP230-ELISA in der indirekten Immunfluoreszenz auf Affenösophagus bestätigt. Auf der Spalthaut zeigte sich allerdings keine Reaktivität. Auch bei dem Patienten (A53) zeigte sich in der indirekten Immunfluoreszenz auf Affenösophagus Fluoreszenzreaktivität an der Basalmembran. Im BIOCHIP®-Mosaik wiesen ein Patient (A54)

mit BP230fl, ein Patient (40/343) mit BP180fl und ein weiterer Patient (28/294) auf der Spalthaut ein positives Ergebnis auf. Letzteres konnte in der indirekten Immunfluoreszenz auf Spalthaut bestätigt werden. Das Serum A64 wurde ebenfalls getestet, da es im Westernblot unklare Banden aufwies, die jedoch nicht reproduzierbar waren. Zur weiteren Prüfung schloss sich eine indirekte Immunfluoreszenz an, bei der sich auf dem Affenösophagus-Substrat ein schwach positives Ergebnis zeigte.

Tab. 4.7: Ergebnistabelle aller positiver Seren nach Gruppe und Testverfahren

	ELISA		WB	BIOCHIP®-Mosaik						IIF	
Pat.-ID.	BP180	BP230	Lam 332	Sp	Öso	BP180 NC16a	BP180 fl	BP230 gC	BP230 fl	Sp	Öso
Morbus Parkinson-Patienten (Kohorten A1+C)											
N5	58,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N38	-	25,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N41	-	-	-	-	-	-	pos	-	-	-	-
11/071	-	26,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anders neurologisch erkrankte Patienten (Kohorte A2)											
41/105	23,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59/144	76,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66/221	30,9	-	-	-	-	pos	-	-	-	-	-
69/234	-	-	-	-	-	-	pos	-	-	-	-
71/227	45,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76/345	-	-	-	-	-	-	-	-	pos	-	-
Kontrollen (Kohorten A3+B)											
A7	20,9	51,0	-	-	-	-	-	-	-	-	pos
A19	-	48,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A23	-	39,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A51	-	22,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A53	-	40,0	-	-	-	-	-	-	-	-	pos
A54	-	-	-	-	-	-	-	-	pos	-	-
A64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	pos
28/294	-	-	-	pos	-	-	-	-	-	pos	-
37/128	-	46,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40/343	-	-	-	-	-	-	pos	-	-	-	-
67/284	35,6	29,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Pat.-ID. = Patienten-Identifikationsnummer; WB= Westernblot; Lam 332= Laminin 332; Sp= Spalthaut; Öso= Ösophagus; fl= full-length; gC= globuläre C-Domäne; IIF= indirekte Immunfluoreszenz

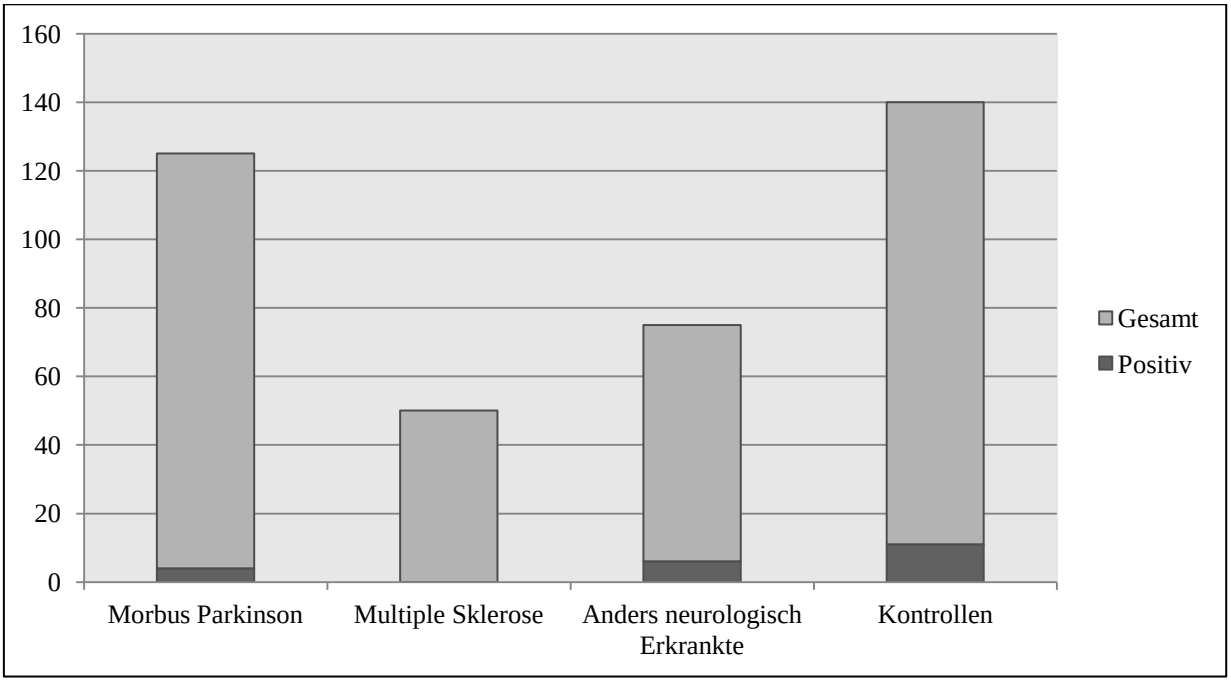


Abb. 4.8: Anzahl (n) der einfach positiv getesteten Seren (Ordinate) in den verschiedenen Gruppen (Abszisse) mittels Säulendiagramm
Morbus Parkinson (n=125): 4 Seren waren einfach positiv (3,2%); Multiple Sklerose (n=50): kein Serum war positiv; Anders neurologisch Erkrankte (n=75): 6 Seren waren positiv (8,0%); Kontrollen (n=140): 11 Seren waren positiv (7,9%)

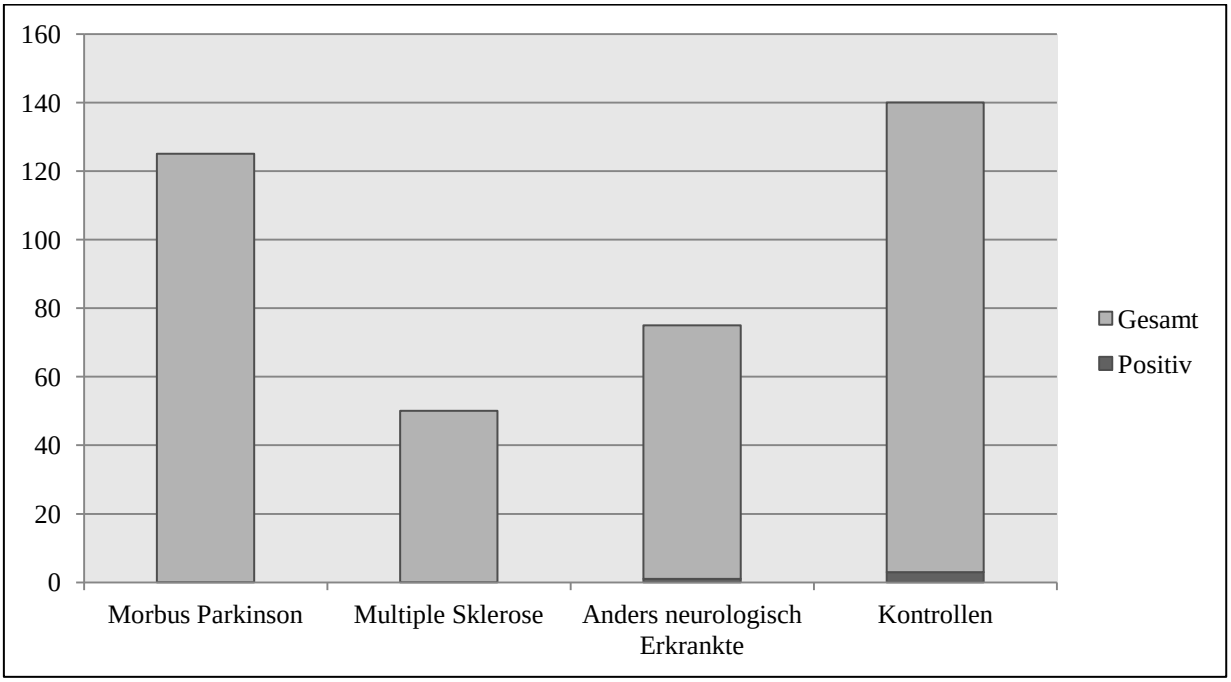


Abb.4.9: Anzahl (n) der mehrfach positiv getesteten Seren (Ordinate) in den verschiedenen Gruppen (Abszisse) mittels Säulendiagramm
Morbus Parkinson (n=125): kein Serum war mehrfach positiv; Multiple Sklerose (n=50): kein Serum war mehrfach positiv; Anders neurologisch Erkrankte (n=75): ein Serum war mehrfach positiv (1,3%); Kontrollen (n=140): 3 Seren waren mehrfach positiv (2,1%)

4.3 Deskriptive Statistik

Tab. 4.8: Ergebnistabelle aller positiv getesteter Seren nach Diagnose und Testverfahren

	Parkinson n (%)	**Multiple Sklerose n (%)**	**Anders neurologisch Erkrankte n (%)**	**Kontrollen n (%)**	**Gesamt n (%)**
ELISA					
BP180 (EU)	1/125 (0,8)	0/50 (0)	4/75 (5,3)	2/140 (1,4)	7/390 (1,8)
BP230 (EU)	2/125 (1,6)	0/50 (0)	0/75 (0)	7/140 (5,0)	9/390 (2,3)
Westernblot					
ECM IgG4	0/125 (0)	0/50 (0)	0/75 (0)	0/140 (0)	0/390 (0)
BIOCHIP®					
BP180-NC16a	0/125 (0)	0/50 (0)	1/75 (1,3)	0/140 (0)	1/390 (0,3)
BP180 fl	1/125 (0,8)	0/50 (0)	1/75 (1,3)	1/140 (0,7)	3/390 (0,8)
BP230 gC	0/125 (0)	0/50 (0)	0/75 (0)	0/140 (0)	0/390 (0)
BP230 fl	0/125 (0)	0/50 (0)	1/75 (1,3)	1/140 (0,7)	1/390 (0,3)
Spalthaut	0/125 (0)	0/50 (0)	0/75 (0)	1/140 (0,7)	1/390 (0,3)
Ösophagus	0/125 (0)	0/50 (0)	0/75 (0)	0/140 (0)	0/390 (0)
Summe	4/125 (3,2)	0/50 (0)	6/75 (8)	11/140 (7,9)	21/390 (5,4)
IIF (IgG)					
Spalthaut	0/4 (0)	0/0 (0)	0/6 (0)	1/12 (8,3)	1/390 (0,26)
Ösophagus	0/4 (0)	0/0 (0)	0/6 (0)	3/12 (25)	3/390 (0,77)
Bestätigt	0/125 (0)	0/0 (0)	0/75 (0)	4/140 (2,9)	4/390 (1,0)

n= Anzahl; EU= Euroimmun; ECM= extrazelluläre Matrix; fl= full-length; gC= globuläre C-Domäne; IIF= indirekte Immunfluoreszenz

Tab. 4.9: Ergebnistabelle der positiven Seren mit Angabe der Konfidenzintervalle

	Kohorte	**n**	**Positiv[1] n % [95%]**	**Bestätigt[2] n % [95%]**
Morbus Parkinson	A1	75	**1** 1,3% [0,2-7,2%]	**0** 0% [0,0-4,9%]
	C	50	**3** 6,0% [2,1-16,2%]	**0** 0% [0,0-7,1%]
Multiple Sklerose	D	50	**0** 0% [0,0-7,1%]	**0** 0% [0,0-7,1%]
Anders neurologisch Erkrankte	A2	75	**6** 8,0% [2,9-14,7%]	**1** 1,3% [0,0-4,9%]
Kontrollen	A3	75	**4** 5,3% [2,9-14,7%]	**1** 1,3% [0,2-7,2%]
	B	65	**7** 10,8% [4,3-18,7%]	**2** 3,1% [1,6-12,7%]

n= Anzahl; [1] Reaktivität in einem Untersuchungsverfahren; [2] Reaktivität bestätigt in einem anderen Untersuchungsverfahren

4.4 Analysen

Antikörper gegen Strukturproteine der dermo-epidermalen Junktionszone konnten in 4 von 175 Patientenseren (2,3%, 95% CI 0,9-5,7%), bestehend aus 125 Morbus Parkinson- und 50 Multiple Sklerose-Patienten, und 17 von 215 Kontrollseren (7,9%, 95% CI 4,6-11,7%) nachgewiesen werden mit Spezifitäten von 98-99% der verwendeten Testsysteme [7,16,170].
Es ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den verschiedenen Kohorten. Weder in der alters- und geschlechtsangepassten Kohorte A noch bei Berücksichtigung aller Kohorten konnte eine Assoziation aufgezeigt werden.

Tab. 4.10: Darstellung der signifikanten Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Kohorten

Krankheitskohorte	Kontrollkohorte	Assoziation[1]
Alters- und geschlechtsentsprechend angepasste Kohorte A		
Morbus Parkinson (Kohorte A1)	Gesunde Kontrollen (Kohorte A3)	**OR= 0,19 [0,00-1,77] p=0,21**
Anders neurologisch Erkrankte (Kohorte A2)	Gesunde Kontrollen (Kohorte A3)	**OR= 1,00 [0,22-4,55] p=1,00**
Morbus Parkinson (Kohorte A1)	Anders neurologisch Erkrankte (Kohorte A2)	**OR= 0,19 [0,00-1,77] p= 0,21**
Alle Kohorten		
Morbus Parkinson Kohorte A1+C	Kontrollen Kohorte A3+B	**OR= 0,39 [0,09-1,36] p= 0,12**
Multiple Sklerose Kohorte D	Kontrollen Kohorte A3+B	**OR= 0,00 [0,0-1,08] p= 0,07**

[1]Die Zusammenhänge wurden mit Hilfe des Fischer's Exact Test berechnet; OR= Odds Ratio, in den eckigen Klammern finden sich die Angaben für das 95% Konfidenzintervall; p-Werte unter 0,05 sind signifikant

5 Diskussion

Das bullöse Pemphigoid (BP) ist die häufigste blasenbildende Autoimmundermatose und eine Erkrankung des höheren Lebensalters. Die Inzidenz nimmt ab dem 60. Lebensjahr deutlich zu und wird bei den über 80-Jährigen mit 300/1 Million Einwohner/Jahr angegeben [60,77,80].
Das hohe Alter der Patienten, ein schlechter Allgemeinzustand sowie Komorbiditäten wie Demenz tragen zu einem erhöhten 1-Jahres-Mortalitätsrisiko bei, das bei 19-41% liegt [38,95,131]. Neben der Assoziation mit Demenz wird auch von einem Zusammenhang mit anderen neurologischen Erkrankungen, wie Morbus Parkinson und Multipler Sklerose, berichtet [3,29,94,96,166]. Diese Assoziationen werden anhand der Tatsache erklärt, dass die beiden Antigene des bullösen Pemphigoids, BP180 und BP230, auch im Gehirn vorkommen. Beide Antigene wurden im Kleinhirn von Ratten gefunden [33] und BP180 konnte auch beim Menschen in verschiedenen Bereichen des Gehirns nachgewiesen werden [159]. Des Weiteren wurde bei Mäusen beobachtet, dass Mutationen im Dystonin-Gen, welches die verschiedenen neuronalen, muskulären und auch epithelialen Isoformen von BP230 kodiert, zu schwerer Dystonie und sensorischer Nervendegeneration führen [61].
Die Krankheitsprozesse sind beim Morbus Parkinson primär neurodegenerativer Genese, während bei der Multiplen Sklerose wohl eine periphere Immunantwort zur Krankheitsentstehung führt und es nachfolgend zu einer Beteiligung des ZNS mit neurodegenerativen Prozessen kommt [67,137]. Im MRT wurde beobachtet, dass es bei der Multiplen Sklerose in akuten Stadien zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke kommen kann, wahrscheinlich ausgelöst durch Mikrotraumata, mikrovaskuläre Schädigungen oder entzündliche Vorgänge. Eine beeinträchtigte Blut-Hirn-Schranke kann zu dem Verlust der immunologischen Sonderstellung des Gehirns führen [26]. Man nimmt nun an, dass die Antigene im Gehirn, die dem Immunsystem zuvor verborgen waren, demaskiert werden, und zu einer Immunantwort mit Bildung von Autoantikörpern gegen BP180 und BP230 führen. Diese Autoimmunantwort könnte dann die Hauterkrankung, das BP, auslösen [3,26,166].
Diese These wird zusätzlich durch die Tatsache untermauert, dass die neurologische Erkrankung in etwa 70% der Fälle dem BP mit einer Latenzzeit von 5,5 Jahren vorausgeht [29,37,168]. Langan et al. wiesen in einer großen populationsbasierten Studie ebenfalls den Zusammenhang zwischen BP und neurologischen Erkrankungen nach [94]. Bei Analyse der Fälle, in denen die neurologische Erkrankung nach der Diagnose eines BP auftrat, konnte keine Assoziation aufgezeigt werden. Dies wird auch durch eine Studie von Langer-Gould et al. unterstützt, bei der Daten von 5.296 Multiple Sklerose-Patienten und 26.478 alters- und

geschlechtsentsprechend angepassten Kontrollen ausgewertet wurden [96]. Hier zeigten die Multiple Sklerose-Patienten eine Odds Ratio von 6,7 (95% CI 1,5-29,9) ein BP zu entwickeln. Die Blut-Hirn-Schranke, die das Gehirn vor dem Übertritt potenziell schädlicher Stoffe schützen soll, scheint auch mit zunehmendem Alter an Funktion einzubüßen. Die altersbedingte Anfälligkeit bestimmten neurologischen Krankheiten gegenüber lässt sich so also in Zusammenhang mit der sich verändernden Blut-Hirn-Schranke sehen [191]. Dies könnte als zusätzlicher Faktor bei der Manifestation des BP, das wie Morbus Parkinson hauptsächlich ältere Menschen betrifft, eine Rolle spielen. In einem murinem Alterungsmodell konnte zudem gezeigt werden, dass eine vaskuläre Permeabilität vorwiegend im Hippocampus nachweisbar ist [122] – die Hirnregion, in der vorwiegend BP180 exprimiert wird [157,159].

Obwohl in erster Linie Menschen über 60 Jahre vom BP betroffen sind, wird auch immer wieder von Fällen jüngerer Patienten berichtet [30]. Eine retrospektive Studie mit 74 BP-Patienten unter 60 Jahren untersuchte die klinischen und immunpathologischen Charakteristika dieser Patientengruppe [18]. Interessanterweise lag bei 13 Patienten (18%) eine neurologische Erkrankung vor, sodass auch altersunabhängige Faktoren eine Rolle zu spielen scheinen.

Die vorliegende kontrollierte prospektive Studie überprüfte, ob entzündliche oder degenerative Vorgänge bei neurologischen Erkrankungen zu der Bildung von Antikörpern gegen BP180 und BP230 führen und somit zur Entwicklung eines BP.

Dafür wurden die Seren von 125 Morbus Parkinson-, 50 Multiple Sklerose- und 75 anders neurologisch erkrankten Patienten mit teils alters- und geschlechtsentsprechend angepassten Kontrollen hinsichtlich der Serumautoantikörper gegen Zielantigene des BP sowie gegen Laminin 332 untersucht. Für die Detektion der Autoantikörper kamen verschiedene Untersuchungsverfahren wie der ELISA, BIOCHIP®-Mosaik, Westernblot und die indirekte Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut und Affenösophagus zum Einsatz.

Im ELISA konnten insgesamt 14 Seren positiv auf Anti-BP180- oder BP230-Antikörper getestet werden. Davon wiesen sieben Seren gegen BP180-NC16a Reaktivität auf und neun Seren gegen BP230. Zwei Seren waren in beiden Testsystemen positiv.

Im BIOCHIP®-Mosaik zeigten sieben Seren Reaktivität auf unterschiedlichen Substraten. Ein Serum wies Antikörper auf, die am Blasendach des artifiziellen Spaltes banden, ein Serum

zeigte Reaktivität gegen BP180-NC16a, drei Seren gegen BP180fl und zwei Seren wiesen positive Ergebnisse für BP230fl auf.

Auffallend ist, dass die rekombinanten Substrate für BP180 und BP230 häufiger positiv waren im Vergleich zu den nativen Substraten Affenösophagus und Spalthaut. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Antigenkonzentration höher ist bei transfizierten Zellen (BP180fl, BP230gC und BP230fl). Dies trifft auch auf das BP180-NC16a-Substrat zu, bei dem der BIOCHIP®-Mosaik mit rekombinantem Protein beschichtet war.

Des Weiteren ist anzumerken, dass der BP180-NC16a-ELISA häufiger positiv war (7 von 390) als das entsprechende Feld im BIOCHIP®-Mosaik (1 von 390). In vorliegender Studie kam ein BP180-ELISA mit tetramerem NC16a zum Einsatz. Dieser wurde erstmals von Sitaru et al. verwendet, die dafür in ihrer Arbeit eine Spezifität von 98% und eine Sensitivität von 90% ermittelten [161]. Diese Werte entsprechen denen einer Metaanalyse, bei der 19 Studien unter Verwendung hauseigener und kommerziell erhältlicher BP180-ELISA mit über 1.000 BP-Patienten ausgewertet wurden [170]. Auch das BIOCHIP®-Mosaik erreicht für das BP180-NC16a-Substrat eine Spezifität von 98-100% sowie eine Sensitivität von 83-100% [7,134,171,190]. Beide Testsysteme scheinen eine ähnlich hohe diagnostische Aussagekraft zu haben [171], jedoch ist beim Vergleich der beiden Verfahren zu erwähnen, dass der Cut-off beim BIOCHIP®-Mosaik nicht so exakt einzustellen ist wie bei dem ELISA. Die Proben wurden im BIOCHIP®-Mosaik nach Angabe des Herstellers 1:10 verdünnt, wobei es allerdings nicht auszuschließen ist, dass andere Verdünnungen, wie möglicherweise 1:12 oder 1:8, geeigneter zur Testdurchführung gewesen wären. Für die Detektion von Serumantikörpern gegen BP230 liegt sowohl im ELISA als auch im BIOCHIP®-Mosaik die Spezifität zwischen 98 und 100%, wohingegen die Sensitivität im ELISA mit 57-72% und im BIOCHIP®-Mosaik mit 39-55% deutlich darunter liegt [7,16,171,187,190]. BP230 ist daher diagnostisch weniger relevant als BP180 und nimmt eine nachrangige Rolle in der Diagnosestellung des BP ein [24,132,144].

Im Westernblot mit extrazellulärer Matrix kultivierter Keratinozyten konnte für kein Serum Reaktivität mit BP180, BP230 oder Laminin 332 detektiert werden. Laminin 332 stellt eines der Zielantigene beim Schleimhautpemphigoid dar und Anti-Laminin 332 Antikörper sind bei 20-25% der davon betroffenen Patienten zu finden [143]. Auch beim BP wurde in einer Studie von Bekou et al. Laminin 332 bei 40% der BP-Patienten nachgewiesen [9]. In einer weiteren Arbeit dazu von Lazarova et al. konnte dies jedoch nicht bestätigt werden [98]. Westernblot-Untersuchungen gehören nicht zur Routinediagnostik des BP und sind nur in

spezialisierten Laboren verfügbar. Da jedoch bei etwa 10% der BP-Patienten keine Antikörper gegen BP180 und BP230 im ELISA nachgewiesen werden können, ist die Kombination verschiedener Testverfahren sinnvoll, da so zirkulierende Antikörper bei nahezu allen BP-Patienten detektiert werden können [46,140].

Die indirekte Immunfluoreszenz schloss sich an die restlichen Untersuchungsmethoden an und wurde nur bei Seren durchgeführt, die in mindestens einem der vorherigen Testsysteme positiv getestet wurden, bzw. bei einem Serum, das unklare Befunde im Westernblot aufwies. Hier zeigte sich bei drei Seren Fluoreszenzreaktivität an der Basalmembran des Affenösophagus und bei einem Serum ließ sich eine Reaktion an der epidermalen Seite des Spaltes nachweisen. Somit konnten hier in drei Fällen die positiven Ergebnisse aus den zuvor durchgeführten Testverfahren bestätigt werden.

Bei Evaluierung der verschiedenen Testsysteme ist anzumerken, dass der Westernblot, die indirekte Immunfluoreszenz und der BIOCHIP®-Mosaik, auf dem Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz basierend, aufgrund ihrer Auswertung und Beurteilung beobachterabhängig sind und somit zu einer Einschränkung der Objektivität und Reliabilität führen.

Nach Betrachtung der einzelnen Testsysteme lassen sich die Ergebnisse auch nach Kohorten geordnet darstellen: Bei den Morbus Parkinson-Patienten wurden im ELISA-Verfahren insgesamt drei Patienten, davon einer im BP180-NC16a-ELISA und zwei im BP230-ELISA, positiv getestet. Bei diesen Patienten blieben die restlichen Testsysteme jedoch negativ. Ein weiterer Morbus Parkinson-Patient wies im BIOCHIP®-Mosaik bei dem BP180fl-Feld Reaktivität auf. Aber auch hier fielen die übrigen Untersuchungen negativ aus. In der indirekten Immunfluoreszenz konnte keines der positiven Ergebnisse bestätigt werden.

Die Seren der Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen wiesen lediglich im ELISA gegen BP180-NC16a Antikörper auf. Bei einem Serum konnten diese Antikörper auch im BIOCHIP®-Mosaik für BP180-NC16a nachgewiesen werden. Zudem zeigte im BIOCHIP®-Mosaik ein Serum ein positives Ergebnis für BP180fl und ein weiteres für BP230fl. Alle anderen Untersuchungen blieben negativ. Bei den Multiple Sklerose-Patienten waren sämtliche Untersuchungen negativ.

Die Ergebnisse der Kontrollseren im ELISA zeigten, dass zwei Patienten Anti-BP180-NC16a- und sieben Patienten Anti-BP230-Autoantikörper aufwiesen. Bei zwei von diesen Patienten waren beide ELISA positiv. Eines davon stammte aus der Kohorte D, entsprach also den Patienten mit einem Alter über 75 Jahren. Hier konnten in der indirekten Immunfluoreszenz

auf Affenösophagus die positiven Ergebnisse aus dem ELISA bestätigt werden. Alle anderen Untersuchungsverfahren blieben negativ. Ein anderes Serum aus derselben Kohorte, das eine positive Reaktion im BP230-ELISA aufwies, zeigte ebenfalls in der indirekten Immunfluoreszenz auf Affenösophagus Reaktivität. Eine prospektive Studie mit Patienten dieser Altersgruppe wurde von van Beek et al. durchgeführt und kam zu dem Schluss, dass Patienten über 70 Jahre mit nicht-entzündlichen Dermatosen keine erhöhte Autoantikörperreaktivität gegen Basalmembranzonenproteine aufweisen [6]. Vorherige Arbeiten zu dem Thema kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen [53,62,183]. Die vorliegenden Daten bestätigen aber, dass ein fortgeschrittenes Alter kein Risikofaktor für die Ausbildung von Autoantikörpern gegen Strukturproteine der dermo-epidermalen Junktionszone ist. Bei den restlichen im ELISA-positiv getesteten Seren konnten die positiven Ergebnisse in den übrigen Testsystemen nicht bestätigt werden.

Im BIOCHIP®-Mosaik zeigten drei Seren positive Ergebnisse, eines auf humaner Spalthaut, eines für BP180fl und eines für BP230fl. Das positive Ergebnis auf der Spalthaut konnte in der entsprechenden indirekten Immunfluoreszenz bestätigt werden. Die restlichen Testsysteme fielen für dieses und die anderen im BIOCHIP®-Mosaik positiv getesteten Seren negativ aus. Ein Serum aus der Kohorte D zeigte im Westernblot unklare Banden, die allerdings nicht reproduzierbar waren. Der ELISA und BIOCHIP®-Mosaik fielen negativ aus, in der indirekten Immunfluoreszenz auf Affenösophagus konnte jedoch ein schwach positives Ergebnis aufgezeigt werden.

Bei keinem der Seren konnte Reaktivität gegen BP180 oder BP230 uneingeschränkt in allen Testsystemen nachgewiesen werden. Antikörper gegen Strukturproteine der dermo-epidermalen Junktionszone konnten bei 4 der 175 Patienten (2,3%; 95% CI 0,9-5,7%), bestehend aus 125 Morbus Parkinson- und 50 Multiple Sklerose-Patienten, und 17 von 215 Kontrollseren (7,9%; 95% CI 4,6-11,7%) nachgewiesen werden mit Spezifitäten von 98-99% der verwendeten Testsysteme [7,16,170].

Weder die Seren der Morbus Parkinson-Patienten noch die der Multiple Sklerose-Patienten zeigten eine signifikant unterschiedliche Anzahl positiver Reaktionen im Vergleich zu den Kontrollen. Auch beim Vergleich innerhalb der alters- und geschlechtsentsprechend angepassten Kohorte konnte kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden. Insgesamt konnte weniger Reaktivität bei den neurologischen Patientenseren im Vergleich zu den Kontrollseren gefunden werden, dies erwies sich jedoch als nicht signifikant.

Zusammenfassend konnte also keine klinisch relevante Erhöhung von Antikörpern gegen BP180 und BP230 bei Morbus Parkinson- und Multiple Sklerose-Patienten nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang zwischen Anti-BP180- und BP230-Antikörpern und neurologischen Erkrankungen ließ sich somit in der vorliegenden Studie nicht aufzeigen.
Das lässt vermuten, dass die Serumreaktivität gegen Strukturproteine der dermo-epidermalen Junktionszone – im Sinne eines „Pre-Disease"-Stadium – dem klinischen Bild eines BP bei Morbus Parkinson- und Multiple Sklerose-Patienten nicht vorausgeht.
Ein Screening auf Anti-BP180- und BP230-Antikörper bei dieser Patientengruppe scheint daher nicht klinisch relevant und notwendig zu sein.
Auffallend ist auch, dass keines der Multiple Sklerose-Seren ein positives Ergebnis aufwies. Hier ist anzunehmen, dass aufgrund der kleinen Kohorte nur eine eingeschränkte Validität besteht. Dieses Problem zeigte sich schon in anderen Studien: Langan et al. führten eine große populationsbasierte Studie mit 868 BP-Patienten und 3.453 alters- und geschlechtsentsprechend angepassten Kontrollen durch, die retrospektiv über eine nationale Gesundheitsdatenbank selektiert wurden. Durch ihre Größe wies die Studie eine hohe statistische Aussagekraft auf und war weniger anfällig für den Erhebungs- und Selektionsbias als vorherige Studien zu dem Thema [94,120]. Eine Assoziation zum BP konnte für Schlaganfälle (OR 1,8), Demenz (OR 3,4), Morbus Parkinson (OR 3,0), Epilepsie (OR 1,7) und Multiple Sklerose (OR 10,7) nachgewiesen werden. Für letztere lassen sich daraus jedoch – bei einer Gesamtzahl von elf Multiple Sklerose-Patienten unter den BP-Patienten und Kontrollen – nur begrenzt Schlüsse ziehen [94].

Eine weitere Studie zum Zusammenhang zwischen BP und Multipler Sklerose wurde von Laffitte et al. durchgeführt [91]. Dabei wurde die Liquorflüssigkeit von 18 Multiple Sklerose-Patienten, zehn Patienten mit anderen entzündlichen ZNS-Erkrankungen und 20 Kontrollen mittels Westernblot untersucht. Im Westernblot wurden zwei rekombinante Fragmente von der epidermalen BP230-Isoform verwendet, die auch Anteile der neuronalen Isoformen umfassten.
Insgesamt unterschied sich das Reaktivitätsprofil zwischen den drei Gruppen hinsichtlich der BP230-Varianten nicht signifikant. Allerdings ließen sich bei 11% der Multiple Sklerose-Patienten Bindungen mit der C-terminalen Domäne eines der rekombinanten BP230-Proteine beobachten, wohingegen die Liquorflüssigkeit aus keiner der anderen beiden Gruppen Reaktivität aufwies. Die gebundene Domäne lässt sich auch bei neuronalen BP230-Isoformen

finden. Die Autoren schlossen daraus, dass ein Teil der Patienten mit Multipler Sklerose Antikörper gegen die neuronalen Isoformen von BP230 bilden kann im Sinne eines intermolekularen „Epitope spreading“. Auch die Tatsache, dass ausschließlich die Liquorflüssigkeit der Multiple Sklerose-Patienten Reaktivität zeigte und die der Gruppe der anders neurologisch erkrankten Patienten keine Reaktivität aufwies, könnte darauf hinweisen, dass die Immunantwort gegen BP230 Multiple Sklerose-spezifisch ist.
Bezüglich des fehlenden signifikanten Unterschiedes in Hinblick auf die BP230-Reaktivität zwischen den Gruppen mit Multipler Sklerose, anderen entzündlichen ZNS-Erkrankungen und Kontrollen entsprechen die Ergebnisse denen der vorliegenden Studie.

Die erste Arbeit, die zeigte, dass Serumantikörper von Patienten mit BP und gleichzeitig vorliegender neurologischer Erkrankung BP230 in Haut und Gehirn erkennen, wurde von Li et al. durchgeführt [102]. Die Seren von zwölf BP-Patienten, bei denen zusätzlich eine neurologische Krankheit [zerebrovaskuläre Erkrankungen mit zerebralen Blutungen (n=3), zerebralen Thrombosen (n=5), vaskulärer Demenz (n=2) und Morbus Alzheimer (n=2)] vorlag, wurden dafür verwendet. Als Kontrollen dienten drei Gruppen: 42 BP-Patienten, 15 neurologisch erkrankte Patienten und 30 gesunde Blutspender. Die Kontrollen waren zudem alters- und geschlechtsentsprechend angepasst. Um die Reaktivität der Seren zu testen, wurde ein Westernblot mit humanem epidermalem Extrakt und einer mit Hirngewebe von Mäusen durchgeführt.
Die Seren der BP-Patienten mit neurologischen Erkrankungen zeigten nicht nur positive Ergebnisse im Westernblot mit epidermalem Extrakt, sondern auch im Westernblot mit Maus-Hirngewebe. Dabei ließ sich Reaktivität gegen die 280-, 230-, 180- und 165kDa-Proteine beobachten. Drei Seren wiesen 230kDa-Banden und ein Serum eine 180kDa-Bande auf. Insgesamt zeigten in der Gruppe die Seren signifikant häufiger ein positives Ergebnis im Vergleich zu der BP-Kontrollgruppe (83% vs. 12%) und zu der neurologischen Kontrollgruppe (83% vs. 13%). Zudem erkannte der polyklonale Anti-BP230-Antikörper die 230kDa-Bande in dem Haut- sowie dem Hirnextrakt. Dies bestätigt die Annahme, dass BP230 als gemeinsames Antigen sowohl beim BP als auch bei neurologischen Erkrankungen fungiert.

An diese Arbeit schloss sich eine weitere Studie an, um zu eruieren, ob die Seren von BP-Patienten mit neurologischen Erkrankungen die BP-Zielantigene nicht nur bei Mäusen,

sondern auch im menschlichen Gehirn erkennen [26]. Es wurden 22 Seren von BP-Patienten mit neurologischen Erkrankungen verwendet und als Kontrollen drei Gruppen mit jeweils 22 alters- und geschlechtsentsprechend angepassten Patienten. Diese bestanden – wie in vorheriger Studie – jeweils aus BP-Patienten, neurologisch Erkrankten [zerebrovaskuläre Erkrankungen mit zerebralen Blutungen (n=5), zerebralen Thrombosen (n=9), vaskulärer Demenz (n=6) und Morbus Alzheimer (n=2)] und gesunden Blutspendern. Als Untersuchungsverfahren kam der Westernblot mit Verwendung von humanen Epidermis- und Hirnextrakten zum Einsatz.
54,5% der BP-Patienten mit neurologischen Erkrankungen zeigten Reaktivität mit dem 230-kDa-Protein im Hirngewebe, was zu den Kontrollgruppen (BP-, neurologische Patienten und gesunde Kontrollen) einen signifikanten Unterschied darstellte (9,1%, 9,1% und 4,5%). Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass Antikörper gegen die neuronale BP230-Isoform mit der epidermalen Form kreuzreagieren. Ein Teil der Seren zeigte auch mit den 180- und 165-kDa-Proteinen im Hirngewebe Reaktivität, was die Anwesenheit von BP180 im Gehirn bestätigt und die Frage nach dessen Bedeutung aufwirft.

Eine weitere Arbeit zum Zusammenhang zwischen dem BP und Multipler Sklerose wurde von Taghipour et al. durchgeführt [169]. In dieser prospektiven Studie wurden die Serumautoantikörper bei sechs Patienten mit BP und Multipler Sklerose charakterisiert und die Seren von 31 Patienten mit ausschließlich Multipler Sklerose auf deren Vorhandensein überprüft. Das Durchschnittsalter bei der BP-Manifestation lag bei 58,5 Jahren und die Multiple Sklerose-Diagnose ging der des BP im Schnitt um 18 Jahre voraus. Das jüngere Durchschnittsalter der Multiple Sklerose-Patienten bei Diagnosestellung eines BP entspricht dem vorheriger Studien [85,166]. Als Kontrollen dienten 43 Seren von Schlaganfall-Patienten und 22 Seren von Patienten über 60 Jahre, die weder eine neurologische Erkrankung noch eine entzündliche Dermatose aufwiesen. Die Seren wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz auf humaner Spalthaut untersucht. Bei positiver Testung schlossen sich ein Westernblot mit epidermalem Extrakt sowie ein ELISA-Verfahren für BP180 und BP230 an.
Bei den sechs Patienten mit gleichzeitig vorliegendem BP und Multipler Sklerose wurde in vier Fällen Reaktivität gegen BP180 und BP230 nachgewiesen, in zwei Fällen nur gegen BP180. Bei den 31 Multiple Sklerose-Patienten konnte kein Serum positiv auf BP180 oder BP230 getestet werden. Ein Serum zeigte mehrfach die Bindung von IgG-Antikörpern an der

epidermalen Seite des Spaltes in der indirekten Immunfluoreszenz, jedoch konnten weder im ELISA noch im Westernblot die Antikörper genauer charakterisiert werden.
Die Autoren stellten zur Diskussion, dass die Antikörper in diesem Fall andere Epitope als BP180-NC16a oder BP230gC binden und deshalb im gängigen ELISA nicht detektierbar wären. Dies könnte auch für den Westernblot gelten, der dann nicht imstande wäre, die Epitope nachzuweisen. Hier wäre eventuell der Einsatz und Gebrauch des BIOCHIP®-Mosaiks mit den Substraten BP180fl und BP230fl, die jeweils die gesamte Länge der Proteine umfassen, aufschlussreich gewesen. In dieser Studie von Taghipour et al. ließen sich ebenfalls keine Antikörper gegen Proteine der dermo-epidermalen Junktionszone nachweisen [164]. Als mögliche Erklärung wird die protektive Funktion der Blut-Hirn-Schranke aufgeführt, die ein Übertreten der Antikörper verhindert. Das Antigen-Profil der Patienten mit gleichzeitig vorliegender Dermatose und neurologischer Erkrankung deutet jedoch darauf hin, dass sowohl BP230 als auch BP180 in der Pathogenese der beiden miteinander assoziierten Erkrankungen eine Rolle zu spielen scheinen. Die Arbeit zeichnet sich wieder durch eine kleine Kohortengröße aus, wodurch – wie schon erwähnt – eine eingeschränkte Validität und Reliabilität resultieren.
Aufgrund einer anderen Methodik, bei der sich nur bei positiven Seren an die indirekte Immunfluoreszenz noch weitere Untersuchungen anschlossen, ist ein direkter Vergleich dieser Ergebnisse mit den vorliegenden Daten nur eingeschränkt möglich. Die Tatsache aber, dass auch hier bei den Multiple Sklerose-Patienten keine Serumantikörper gefunden wurden, untermauert die Resultate der vorliegenden Studie.

Taghipour et al. führten eine weitere Studie durch, bei der die immunpathologischen Charakteristika von BP-Patienten mit neurologischen Erkrankungen genauer untersucht werden sollten [167]. Dafür wurden 43 BP-Patienten mit und 29 BP-Patienten ohne neurologische Erkrankung miteinander verglichen. Unter den neurologischen Krankheiten fanden sich zerebrovaskuläre Erkrankungen (n=27), Demenz (n=12), Epilepsie (n=7), Morbus Parkinson (n=4), sensorineurale Schwerhörigkeit (n=2) und Motoneuronen-Erkrankungen (n=1). Als Testverfahren kamen die indirekte Immunfluoreszenz auf Spalthaut, der Westernblot mit epidermalen Extrakten und der BP180-NC16a- und BP230- ELISA zum Einsatz. Zwischen den beiden Gruppen konnte weder in Hinblick auf die Antikörpertiter noch auf die Zielantigene ein Unterschied ausgemacht werden. Auch hier konnte also kein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von BP180 und/oder BP230 und dem

Vorhandensein einer neurologischen Erkrankung aufgezeigt werden analog zu vorliegenden Ergebnissen.
Die Ergebnisse von Taghipour et al. deuten aber darauf hin, dass beide Gruppen eine ähnliche Immunantwort gegen die Zielantigene aufweisen und der Zusammenhang zwischen Haut und ZNS nicht von einem bestimmten Antigen abhängt, sondern beide dafür bedeutend sind.

Gambichler et al. beobachteten, dass erhöhte Serumspiegel von Antikörpern gegen BP180 und eine Eosinophilie im Serum mit dem Vorliegen einer neurologischen Erkrankung korrelieren [55]. Dafür werteten sie Daten von 161 BP-Patienten aus, von denen 85 eine neurologische Erkrankung [Demenz (n=41), Schlaganfall (n=15), Morbus Parkinson (n=12) und nicht näher bezeichnete neurologische Erkrankungen (n=17)] aufwiesen. Hier zeigten sich im ELISA für Anti-BP180-Antikörper Mittelwerte von 115 U/L bei zusätzlichem Vorhandensein einer neurologischen Erkrankung und 48 U/L, wenn lediglich ein BP vorlag. BP230-Antikörpertiter wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen neurologischen und nicht-neurologischen BP-Patienten auf (25 U/L vs. 22,5 U/L).
Die Autoren der Studie vermuteten, dass die erhöhten Serumspiegel von Anti-BP180-Antikörpern und eine periphere Eosinophilie schwerwiegendere Krankheitsverläufe widerspiegeln. Ausgehend von den Daten von Li et al. und Chen et al. [26,102] rekrutierten Gamblicher und Mitarbeiter im Anschluss neun weitere BP-Patienten mit Anti-BP180-Serumreaktivität und neurologischer Erkrankung [Demenz (n=4), spinale Muskeldystrophie (n=1), keine Angabe zu den restlichen 4 Patienten] und untersuchten diese mittels BIOCHIP®-Mosaik. Als Substrat wurde Nervengewebe aus verschiedenen Hirnregionen von Ratten und Affen verwendet. Sechs Seren zeigten keinerlei Fluoreszenzreaktivität und bei drei Seren war ein unspezifisches granuläres Muster nachweisbar, jedoch konnte kein spezifisches Zielantigen ausgemacht werden.
Gamblicher et al. konnten also wie auch die vorliegende Studie nicht bestätigen, dass die Bindung von Anti-BP180-Antikörpern in Nervengewebe eine Rolle bei neurologischen Erkrankungen spielt. Diese Diskrepanz zu vorherigen Studien erklären die Autoren durch eine unterschiedliche Methodik. Allerdings scheinen eine Eosinophilie und erhöhte Anti-BP180-Autoantikörperspiegel Prädiktoren für das Vorliegen von neurologischen Krankheiten zu sein. Dies beobachteten bereits Foureur et al., die einen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Anti-BP180-Antikörpern und Demenz bei Patienten ohne klinische Anzeichen für ein BP aufzeigten [53].

Zu einem anderen Schluss kamen in einer rezenten Studie Messingham et al. [113]. Sie untersuchten 24 Seren von Parkinson- und 26 Demenzpatienten sowie 23 alters- und geschlechtsentsprechend angepasste Kontrollen. Die Untersuchung im ELISA auf Anti-BP180-NC16a- und BP230-Antikörper erwies sich, wie bei den vorliegenden Daten, als unauffällig. Ein anschließender Westernblot mit Fusionsproteinen, die die gesamte extrazelluläre (sec180) und intrazelluläre Domäne (NC16C) von BP180 umfassten, wurde durchgeführt und mittels densitometrischer Analyse ausgewertet. Hier zeigten 7 von 24 Parkinson-Seren und 1 von 26 Demenz-Seren Reaktivität gegenüber sec180, was sich – nach Ausschluss eines Ausreißers – als signifikant erwies. Ansonsten wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Vier Patienten, die eine starke Reaktivität gegen BP180 aufwiesen, wurden dann mittels indirekter Immunfluoreszenz auf humaner Haut untersucht. Hier reagierte keines der Seren der neurologischen Patienten mit der Basalmembranzone im Gegensatz zu den BP-Kontrollseren. Dies könnte darauf hinweisen, dass sich die Epitope beim BP180 – je nachdem, ob es aus der Haut oder dem Gehirn stammt – unterscheiden. Um zu eruieren, ob die Anti-BP180-Antikörper die Verbindung zwischen BP und Morbus Parkinson herstellen können, wurde die Serumreaktivität auf Tyrosin-Hydroxylase-positive dopaminerge Neurone (TH^+), die beim Morbus Parkinson degenerieren, untersucht. Als Methode diente dafür die indirekte Immunfluoreszenz mit Substantia nigra der Ratte als Substrat. Getestet wurden die Parkinson-Seren, die im sec180-Blot positiv waren (n=4). Bei allen vier Seren kolokalisierten die Antikörper mit den dopaminergen Neuronen im Gegensatz zu den Kontrollen und den im Westernblot-negativen Parkinson-Seren. Die Ergebnisse konnten auch auf humaner Substantia nigra bestätigt werden. Anschließend wurden Patientenseren getestet, bei denen gleichzeitig ein BP und Morbus Parkinson vorlag (n=5). Bei 3 von 5 Seren konnte eine Kolokalisierung mit TH^+-Neuronen beobachtet werden. Interessanterweise wurden die Patienten der zwei negativen Seren systemisch mit Steroiden behandelt.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein knappes Drittel der Parkinson-Patienten Antikörper gegen BP180 aufweist, die auch TH^+-Neurone binden. Diese Antikörper reagieren jedoch nicht mit der Haut, sodass davon ausgegangen werden kann, dass sie sich vom neuronalen BP180 ableiten. Die fehlende Reaktivität der neurologischen Seren in dieser Studie im ELISA und der indirekten Immunfluoreszenz auf humaner Haut entsprechen denen der vorliegenden Arbeit. Ausgehend von den Ergebnissen von Messingham et al. könnte die Erklärung – wie

schon erwähnt – dafür sein, dass die Anti-BP180-Antikörper vom neuronalen BP180 abstammen und somit die Epitope des kutanen BP180 nicht erkennen. Dass in der vorliegenden Arbeit keines der Seren Reaktivität im Westernblot aufwies im Gegensatz zu der Studie von Messingham et al., mag daran liegen, dass dort das Testverfahren mit Fusionsproteinen durchgeführt wurde anstatt mit Extrakten kultivierter Keratinozyten. Die in dieser Studie im Westernblot erhobenen negativen Ergebnisse untermauern die obige Schlussfolgerung der verschiedenen kutanen und neuronalen Epitope. Allerdings muss erwähnt werden, dass in vorliegender Arbeit im BIOCHIP®-Mosaik für BP180fl ebenfalls keine Reaktivität nachgewiesen wurde. Hier wären weitere Untersuchungen, wie beispielsweise ein Westernblot mit Nervengewebe und/oder BP180fl-umfassenden Fusionsproteinen oder ein BIOCHIP®-Mosaik mit der extrazellulären Domäne von BP180 aufschlussreich gewesen, um der Frage nach der Reaktivität und somit Herkunft der Autoantikörper nachzugehen.

In Zusammenschau aller Studien ist noch nicht abschließend geklärt, welche genaue Rolle BP180 und BP230 hinsichtlich der neurodermatologischen Assoziation spielen. Eine Reihe von Arbeiten legt jedoch die Bedeutung beider Antigene in der Pathogenese neurologischer und dermatologischer Krankheitsprozesse nahe.

Interessant ist auch der fehlende Zusammenhang zwischen der Epidermolysis bullosa junctionalis non-Herlitz und neurologischen Erkrankungen [156]. Wichtig scheint nicht nur die Verminderung oder Beeinträchtigung von BP180 zu sein, so wie sie bei der Epidermolysis bullosa junctionalis non-Herlitz durch Mutationen im entsprechendem Gen erfolgt [124], sondern vermutlich auch die Entzündungsreaktion gegen das Antigen, die durch eine erhöhte vaskuläre Permeabilität und dadurch begünstigte transendotheliale Einwanderung von Entzündungszellen auftritt [156].

In einer Studie von Wieland et al. wurden 337 dermatologisch gesunde Patienten auf die Anwesenheit von Anti-BP180- und BP230-Antikörper untersucht [183]. 25 der Patienten (7,4%) wiesen Antikörper gegen mindestens eines der beiden Antigene auf, wobei hinsichtlich des Alters oder des Geschlechts kein signifikanter Unterschied ausgemacht werden konnte. Wenn man nun annimmt, dass einzig allein das Vorhandensein der Antikörper zu der Ausbildung eines BP führt, wäre eine höhere Prävalenz von Antikörpern bei älteren Menschen zu erwarten. Die Autoren spekulierten nun, dass noch unbekannte auslösende Faktoren zur Krankheitsentstehung bei Personen mit Suszeptibilität für die Erkrankung

führten. Fünf Jahre später wurden die 25 zuvor auf Anti-BP180- und BP230-Antikörper positiv getesteten Patienten nachverfolgt und auf neu hinzugekommene Diagnosen überprüft [186]. Von den 24 Patienten, deren Daten verfügbar waren, hatte in den fünf Jahren keiner ein BP entwickelt. Daraus lässt sich ableiten, dass das Vorkommen von Anti-BP180- und Anti-BP230-Antikörpern bei hautgesunden Patienten nicht zur Ausbildung eines BP oder einer anderen Dermatose führt, zumindest nicht über einen kurzfristigen Zeitraum. Bei vier der Patienten (17%) lag nach den fünf Jahren eine Demenz vor – eine Beobachtung, die sich hinsichtlich der Anti-BP180-Antikörper in die Daten von Foueur et al. und Gamblicher et al. einreiht [53,55]. Die Frage, ob Anti-BP180- und/oder Anti-BP230-Antikörper Marker für die Entwicklung einer neurologischen Erkrankung sind, bleibt jedoch bestehen. Zudem ist es weiterhin unklar, ob und wenn ja, welche Bedeutung Anti-BP180- und BP230-Antikörpern zukommt, wenn keine Hautveränderungen vorliegen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass nicht die neurodegenerativen Vorgänge alleine für die Bildung der Autoantikörper verantwortlich sind. Möglicherweise erhöhen Umweltfaktoren die Anfälligkeit sowohl für neurologische Erkrankungen als auch für das BP. Denkbar wäre ein multifaktorielles Krankheitsmodell, bei dem zusätzlich zum Vorhandensein von spezifischen Autoantikörpern weitere Trigger wie Umweltfaktoren, Infektionen, Komorbiditäten oder die Einnahme bestimmter Medikamente eine Rolle in der Auslösung der Dermatose spielen.

Solch einen auslösenden Faktor könnten abgelaufene oder bestehende Infektionen darstellen. Ein Virus aus der Gruppe der Herpesviren, das sowohl die Haut als auch das ZNS befällt, ist das Varizella-Zoster-Virus. Es wäre möglich, dass dieser Umstand den Zusammenhang zwischen dem BP und neurologischen Erkrankungen erklären kann. Kamiya et al. beobachteten, dass der BP180-Antikörpertiter mit dem Verlauf einer Varizella-Zoster-Erkrankung korrelierte und vermuteten, dass die Bildung von Anti-BP180-Antikörpern durch die Reaktivierung des Virus getriggert wurde [81].

Mehrfach wurde auch von Fällen berichtet, bei denen ein BP durch eine Influenzaimpfung ausgelöst wurde [179,181]. Dabei wird angenommen, dass es bei der Impfung zu einer Entzündung in der Haut mit Störung der Basalmembranstruktur und daraus resultierender Bildung von Antikörpern kommt [181]. Interessanterweise wird auch bei einer Influenzainfektion von einer Beteiligung des Nervensystems ausgegangen. In einzelnen Fällen verursacht das Virus akute Enzephalopathien. Bei der Post-Influenza-Enzephalitis wird

vermutet, dass es sich um einen autoimmunen Prozess mit Demyelinisierung und Vaskulopathie handelt [66].

Eine weitere These besagt, dass die Entstehung von Autoimmunität gegen Antigene im ZNS mit Reparaturmechanismen des Nervensystems zusammenhängt. Die T-Zellen, die im Rahmen einer Autoimmunreaktion aktiviert werden, scheinen am Heilungsprozess im ZNS beteiligt zu sein [153]. Um diese protektive Autoimmunität zu verstärken, bedarf es des Verlustes der peripheren Immuntoleranz gegenüber Antigenen im ZNS. In diesem Sinne könnte es zur Ausbildung der Autoimmundermatose kommen bei dem Versuch des Organismus, das Gehirn zu schützen [152].

6 Ausblick

In zukünftigen Studien sollten weitere Faktoren, die an der Krankheitsentstehung beteiligt sein könnten, untersucht werden. Hierzu gehören unter anderem Infektionen, Impfungen und Medikamente.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass ein klinisch latentes „Pre-Disease"-Stadium unwahrscheinlich ist. Nachfolgende Studien könnten dies weiter untersuchen und mit möglichst großen Patientengruppen, neurologisch Erkrankte über einen längeren Zeitraum auf Anti-BP180- und BP230-Antikörper screenen, um zu eruieren, ob im Verlauf ein Toleranzverlust gegen BP180 und/oder BP230 erfolgt. Hierfür könnte man sich auf die am besten validierten Untersuchungsverfahren, die BP180- und BP230-ELISA, beschränken und mit deren Serumspiegeln den Verlauf dokumentieren. Gemäß den Daten von Messingham et al. [113] wären auch Untersuchungen wünschenswert, bei denen sich die Testverfahren nicht nur auf die kutanen Zielantigene begrenzen, sondern auch die neuronalen Formen – insbesonders von BP180 – umfassen. Es wäre aufschlussreich zu sehen, zu welchem Zeitpunkt das „Epitope spreading"-Phänomen von der neuronalen zu der kutanen Form stattfindet.
Eine weitere Frage, die noch Klärung bedarf, ist, ob und wenn ja, welche Rolle BP-Antikörper in der Pathogenese neurologischer Erkrankungen spielen.

Zudem wäre es interessant, das Vorkommen von Antikörpern gegen BP180 und BP230, die bei einem Teil von gesunden Blutspendern nachgewiesen wurden, weiter zu untersuchen [127]. Da es sich beim BP um eine seltene Erkrankung handelt, sind prospektive Studien, die das Vorliegen von BP-Antikörpern als Prädiktoren für die Krankheitsentstehung überprüfen, kaum praktikabel. Um solch eine Studie durchzuführen, könnte es sinnvoll sein, Personen auszuwählen, die prädisponiert für die Ausbildung eines BP sind, um zu überprüfen, ob eine erhöhte Autoreaktivität vorliegt.

7 Zusammenfassung

Beim bullösen Pemphigoid (BP), der häufigsten blasenbildenden Autoimmundermatose, liegen Autoantikörper gegen zwei Strukturproteine der dermo-epidermalen Junktionszone, BP180 und BP230, vor. Die Erkrankung betrifft vor allem ältere Menschen und ist in 30-50% der Fälle mit neurologischen Erkrankungen, wie Morbus Parkinson und Multiple Sklerose, assoziiert.

In der vorliegenden prospektiven Studie wurde die Hypothese überprüft, ob es durch die entzündlichen und/oder degenerativen Prozesse bei Morbus Parkinson und Multipler Sklerose zur Induktion einer Autoantikörperantwort gegen BP180 und BP230 kommt und somit zu einem vermehrten Auftreten von Antikörpern gegen die BP-Zielantigene im Serum dieser Patienten.

Dafür wurden die Seren von drei alters- und geschlechtsentsprechend angepassten Patientengruppen, bestehend aus jeweils 75 Morbus Parkinson-Patienten, 75 Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen und 75 gesunden Kontrollen, untersucht. Hinzu kamen weitere 50 Seren von Morbus Parkinson-Patienten, 50 Seren von Multiple Sklerose-Patienten und 65 Kontrollseren von Patienten ohne Anhalt auf entzündliche Hauterkrankungen mit einem Alter über 75 Jahre.

Zum Nachweis der Anti-BP180- und BP230-Antikörper wurden vier verschiedene Testsysteme verwendet: ein kommerzielles ELISA-Verfahren (Euroimmun) für BP180-NC16a und BP230, ein Westernblot unter Verwendung extrazellulärer Matrix kultivierter humaner Keratinozyten, ein BIOCHIP®-Mosaik, auf dem Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz basierend, mit den Substraten Affenösophagus, humane Spalthaut, BP180-NC16a, BP180 full-length, BP230 globuläre C-Domäne und BP230 full-length sowie die indirekte Immunfluoreszenz auf Affenösophagus und humaner Spalthaut in einem anderen Herstellungsverfahren.

Insgesamt konnten Anti-BP180- und BP230-Antikörper bei 4 der 175 Patienten (2,3%; 95% CI 0,9-5,7%), bestehend aus 125 Morbus Parkinson- und 50 Multiple Sklerose-Patienten, detektiert werden und bei 17 der 215 Kontrollseren (7,9%; 95% CI 4,6-11,7%). Für keines der Seren konnte Reaktivität gegen BP180 oder BP230 in allen Testsystemen aufgezeigt werden.

Zusammenfassend ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl positiver Seren für Anti-BP180- und BP230-Antikörper bei Morbus Parkinson- und Multiple Sklerose-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen nachweisen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Morbus Parkinson und Multipler Sklerose keine klinisch relevant erhöhte Inzidenz von Antikörpern gegen BP180 und BP230 aufweisen. Die Reaktivität gegen die beiden Zielantigene des BP scheint der klinischen Manifestation des BP bei Morbus Parkinson- und Multiple Sklerose-Patienten nicht vorauszugehen. Möglicherweise existieren Umweltfaktoren, die gleichzeitig die Anfälligkeit gegenüber neurologischen Erkrankungen sowie blasenbildenden Autoimmundermatosen erhöhen.

Ausgehend von diesen Daten ist es nicht notwendig, Patienten mit Morbus Parkinson und Multipler Sklerose auf Anti-BP180- und BP230-Antikörper zu screenen. Der neurodegenerative Prozess allein scheint bei neurologischen Patienten nicht der Auslöser für die Bildung von Autoantikörpern gegen Strukturproteine der dermo-epidermalen Junktionszone zu sein.

8 Literaturverzeichnis

[1] Arbesman CE, Wypych JI, Reisman RE, Beutner EH. IgE levels in sera of patients with pemphigus or bullous pemphigoid. Arch Dermatol. 1974 Sep;110(3):378–381.

[2] Asbrink E, Hovmark A. Serum IgE levels in patients with bullous pemphigoid and its correlation to the activity of the disease and anti-basement membrane zone antibodies. Acta Derm. Venereol. 1984;64(3):243–246.

[3] Bastuji-Garin S, Joly P, Lemordant P, Sparsa A, Bedane C, Delaporte E, Roujeau J-C, Bernard P, Guillaume J-C, Ingen-Housz-Oro S, Maillard H, Pauwels C, Picard-Dahan C, Dutronc Y, Richard M-A. Risk Factors for Bullous Pemphigoid in the Elderly: A Prospective Case–Control Study. J Invest Dermatol. 2011 März;131(3):637–643.

[4] Bastuji-Garin S, Joly P, Picard-Dahan C, Bernard P, Vaillant L, Pauwels C, Salagnac V, Lok C, Roujeau JC. Drugs associated with bullous pemphigoid. A case-control study. Arch Dermatol. 1996 März;132(3):272–276.

[5] Baum S, Sakka N, Artsi O, Trau H, Barzilai A. Diagnosis and classification of autoimmune blistering diseases. Autoimmunity Reviews. 2014 Apr;13(4–5):482–489.

[6] van Beek N, Dohse A, Riechert F, Krull V, Recke A, Zillikens D, Schmidt E. Serum autoantibodies against the dermal-epidermal junction in patients with chronic pruritic disorders, elderly individuals and blood donors prospectively recruited. Br. J. Dermatol. 2014 Apr;170(4):943–947.

[7] van Beek N, Rentzsch K, Probst C, Komorowski L, Kasperkiewicz M, Fechner K, Bloecker IM, Zillikens D, Stöcker W, Schmidt E. Serological diagnosis of autoimmune bullous skin diseases: prospective comparison of the BIOCHIP mosaic-based indirect immunofluorescence technique with the conventional multi-step single test strategy. Orphanet J Rare Dis. 2012;7:49.

[8] van Beek N, Schulze FS, Zillikens D, Schmidt E. IgE-mediated mechanisms in bullous pemphigoid and other autoimmune bullous diseases. Expert Rev Clin Immunol. 2016;12(3):267–277.

[9] Bekou V, Thoma-Uszynski S, Wendler O, Uter W, Schwietzke S, Hunziker T, Zouboulis CC, Schuler G, Sorokin L, Hertl M. Detection of Laminin 5-Specific Auto-antibodies in Mucous Membrane and Bullous Pemphigoid Sera by ELISA. Journal of Investigative Dermatology. 2005 Apr;124(4):732–740.

[10] Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JPA, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. Lancet Neurol. 2015 März;14(3):263–273.

[11] Bernard P, Vaillant L, Labeille B, Bedane C, Arbeille B, Denoeux JP, Lorette G, Bonnetblanc JM, Prost C. Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group. Arch Dermatol. 1995 Jan;131(1):48–52.

[12] Bernard P, Venot J, Constant F, Bonnetblane J-M. Blood eosinophilia as a severity marker for bullous pemphigoid. Journal of the American Academy of Dermatology. 1987 Apr 1;16(4):879–881.

[13] Bernier G, Brown A, Dalpé G, De Repentigny Y, Mathieu M, Kothary R. Dystonin expression in the developing nervous system predominates in the neurons that degenerate in dystonia musculorum mutant mice. Mol. Cell. Neurosci. 1995 Dez;6(6):509–520.

[14] Bertram F, Bröcker E-B, Zillikens D, Schmidt E. Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. 2009 Mai;7(5):434–439.

[15] Bing L, Xiping Z, Li L, Jun P, Yi-Xia W, Min Y, Qing L, Qiu-Ning S, Hong-Zhong J, Ya-Gang Z. Levels of anti-BP180 NC16A IgE do not correlate with severity of disease in the early stages of bullous pemphigoid. Arch. Dermatol. Res. 2015 Nov;307(9):849–854.

[16] Blöcker IM, Dähnrich C, Probst C, Komorowski L, Saschenbrecker S, Schlumberger W, Stöcker W, Zillikens D, Schmidt E. Epitope mapping of BP230 leading to a novel enzyme-linked immunosorbent assay for autoantibodies in bullous pemphigoid. British Journal of Dermatology. 2012 Mai 1;166(5):964–970.

[17] Borradori L, Sonnenberg A. Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. J. Invest. Dermatol. 1999 Apr;112(4):411–418.

[18] Bourdon-Lanoy E, Roujeau J-C, Joly P, Guillaume J-C, Bernard P, Prost C, Tancrède-Bohin E, Delaporte E, Picard-Dahan C, Albes B, Bedane C, Doutre M-S, Chosidow O, Lok C, Pauwels C, Chevrand-Breton J, Sassolas B, Richard M-A. [Bullous pemphigoid in young patients: a retrospective study of 74 cases]. Ann Dermatol Venereol. 2005 Feb;132(2):115–122.

[19] Brick KE, Weaver CH, Savica R, Lohse CM, Pittelkow MR, Boeve BF, Gibson LE, Camilleri MJ, Wieland CN. A population-based study of the association between bullous pemphigoid and neurologic disorders. J. Am. Acad. Dermatol. 2014 Dez;71(6):1191–1197.

[20] Brown A, Bernier G, Mathieu M, Rossant J, Kothary R. The mouse dystonia musculorum gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1. Nat. Genet. 1995 Juli;10(3):301–306.

[21] Büdinger L, Borradori L, Yee C, Eming R, Ferencik S, Grosse-Wilde H, Merk HF, Yancey K, Hertl M. Identification and characterization of autoreactive T cell responses to bullous pemphigoid antigen 2 in patients and healthy controls. J. Clin. Invest. 1998 Dez 15;102(12):2082–2089.

[22] Bushkell LL, Jordon RE. Bullous pemphigoid: a cause of peripheral blood eosinophilia. J. Am. Acad. Dermatol. 1983 Mai;8(5):648–651.

[23] Chan LS, Vanderlugt CJ, Hashimoto T, Nishikawa T, Zone JJ, Black MM, Wojnarowska F, Stevens SR, Chen M, Fairley JA, Woodley DT, Miller SD, Gordon

KB. Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases. J. Invest. Dermatol. 1998 Feb;110(2):103–109.

[24] Charneux J, Lorin J, Vitry F, Antonicelli F, Reguiai Z, Barbe C, Tabary T, Grange F, Bernard P. Usefulness of BP230 and BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assays in the initial diagnosis of bullous pemphigoid: a retrospective study of 138 patients. Arch Dermatol. 2011 März;147(3):286–291.

[25] Chaudhuri KR, Schapira AHV. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. Lancet Neurol. 2009 Mai;8(5):464–474.

[26] Chen J, Li L, Chen J, Zeng Y, Xu H, Song Y, Wang B. Sera of elderly bullous pemphigoid patients with associated neurological diseases recognize bullous pemphigoid antigens in the human brain. Gerontology. 2011;57(3):211–216.

[27] Chen R, Fairley JA, Zhao M-L, Giudice GJ, Zillikens D, Diaz LA, Liu Z. Macrophages, but not T and B lymphocytes, are critical for subepidermal blister formation in experimental bullous pemphigoid: macrophage-mediated neutrophil infiltration depends on mast cell activation. J. Immunol. 2002 Okt 1;169(7):3987–3992.

[28] Chen R, Ning G, Zhao M-L, Fleming MG, Diaz LA, Werb Z, Liu Z. Mast cells play a key role in neutrophil recruitment in experimental bullous pemphigoid. Journal of Clinical Investigation. 2001 Okt 15;108(8):1151–1158.

[29] Chen YJ, Wu CY, Lin MW, Chen TJ, Liao KK, Chen YC, Hwang CY, Chu SY, Chen CC, Lee DD, Chang YT, Wang WJ, Liu HN. Comorbidity profiles among patients with bullous pemphigoid: a nationwide population-based study: Comorbidity profiles among patients with BP. British Journal of Dermatology. 2011 Sep;165(3):593–599.

[30] Chimanovitch I, Hamm H, Georgi M, Kroiss M, Stolz W, Apitz C, Bröcker EB, Zillikens D. Bullous pemphigoid of childhood: autoantibodies target the same epitopes within the NC16A domain of BP180 as autoantibodies in bullous pemphigoid of adulthood. Arch Dermatol. 2000 Apr;136(4):527–532.

[31] Chorzelski TP. Coexistence of Malignancies With Bullous Pemphigoid. Archives of Dermatology. 1978 Juni 1;114(6):964.

[32] Chuang TY, Korkij W, Soltani K, Clayman J, Cook J. Increased frequency of diabetes mellitus in patients with bullous pemphigoid: a case-control study. J. Am. Acad. Dermatol. 1984 Dez;11(6):1099–1102.

[33] Claudepierre T, Manglapus MK, Marengi N, Radner S, Champliaud M-F, Tasanen K, Bruckner-Tuderman L, Hunter DD, Brunken WJ. Collagen XVII and BPAG1 expression in the retina: Evidence for an anchoring complex in the central nervous system. The Journal of Comparative Neurology. 2005 Juni 27;487(2):190–203.

[34] Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. The Lancet. 2002 Apr 6;359(9313):1221–1231.

[35] Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. The Lancet. 2008 Okt 31;372(9648):1502–1517.

[36] Connolly BS, Lang AE. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. JAMA. 2014 Apr 23;311(16):1670–1683.

[37] Cordel N, Chosidow O, Hellot M-F, Delaporte E, Lok C, Vaillant L, Bernard P, D'Incan M, Roujeau JC, Joly P, French Study Group of Bullous Diseases. Neurological disorders in patients with bullous pemphigoid. Dermatology. 2007;215(3):187–191.

[38] Cortés B, Khelifa E, Clivaz L, Cazzaniga S, Saurat JH, Naldi L, Borradori L. Mortality rate in bullous pemphigoid: a retrospective monocentric cohort study. Dermatology. 2012;225(4):320–325.

[39] Cozzani E, Gasparini G, Burlando M, Drago F, Parodi A. Atypical presentations of bullous pemphigoid: Clinical and immunopathological aspects. Autoimmun Rev. 2015 Mai;14(5):438–445.

[40] Dainichi T, Nishie W, Yamagami Y, Sonobe H, Ujiie H, Kaku Y, Kabashima K. Bullous pemphigoid suggestive of complement-independent blister formation with anti-BP180 IgG4 autoantibodies. Br. J. Dermatol. 2016 Jan 22;

[41] Dănescu S, Chiorean R, Macovei V, Sitaru C, Baican A. Role of physical factors in the pathogenesis of bullous pemphigoid: Case report series and a comprehensive review of the published work. J. Dermatol. 2016 Feb;43(2):134–140.

[42] Delaporte E, Dubost-Brama A, Ghohestani R, Nicolas JF, Neyrinck JL, Bergoend H, Janin A, Capron M. IgE autoantibodies directed against the major bullous pemphigoid antigen in patients with a severe form of pemphigoid. J. Immunol. 1996 Okt 15;157(8):3642–3647.

[43] Delgado JC, Turbay D, Yunis EJ, Yunis JJ, Morton ED, Bhol K, Norman R, Alper CA, Good RA, Ahmed R. A common major histocompatibility complex class II allele HLA-DQB1* 0301 is present in clinical variants of pemphigoid. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1996 Aug 6;93(16):8569–8571.

[44] Di Zenzo G, Grosso F, Terracina M, Mariotti F, De Pita O, Owaribe K, Mastrogiacomo A, Sera F, Borradori L, Zambruno G. Characterization of the Anti-BP180 Autoantibody Reactivity Profile and Epitope Mapping in Bullous Pemphigoid Patients1. Journal of Investigative Dermatology. 2004 Jan;122(1):103–110.

[45] Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Calabresi V, Fontao L, Hofmann SC, Lacour J-P, Sera F, Bruckner-Tuderman L, Zambruno G, Borradori L, Hertl M. Demonstration of epitope-spreading phenomena in bullous pemphigoid: results of a prospective multicenter study. J. Invest. Dermatol. 2011 Nov;131(11):2271–2280.

[46] Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Fontao L, Calabresi V, Hofmann SC, Hellmark T, Sebbag N, Pedicelli C, Sera F, Lacour J-P, Wieslander J, Bruckner-Tuderman L, Borradori L, Zambruno G, Hertl M. Multicenter prospective study of the humoral

autoimmune response in bullous pemphigoid. Clinical Immunology. 2008 Sep;128(3):415–426.

[47] Döpp R, Schmidt E, Chimanovitch I, Leverkus M, Bröcker E-B, Zillikens D. IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC 16A domain of BP 180 in bullous pemphigoid: Serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. Journal of the American Academy of Dermatology. 2000 Apr;42(4):577–583.

[48] Feldrihan V, Licarete E, Florea F, Cristea V, Popescu O, Sitaru C, Chiriac MT. IgG antibodies against immunodominant C-terminal epitopes of BP230 do not induce skin blistering in mice. Hum. Immunol. 2014 Apr;75(4):354–363.

[49] Feliciani C, Joly P, Jonkman MF, Zambruno G, Zillikens D, Ioannides D, Kowalewski C, Jedlickova H, Kárpáti S, Marinovic B, Mimouni D, Uzun S, Yayli S, Hertl M, Borradori L. Management of bullous pemphigoid: the European Dermatology Forum consensus in collaboration with the European Academy of Dermatology and Venereology. Br. J. Dermatol. 2015 Apr;172(4):867–877.

[50] Feng S, Wu Q, Jin P, Lin L, Zhou W, Sang H, Shao C. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. International Journal of Dermatology. 2008 März;47(3):225–228.

[51] Fichel F, Barbe C, Joly P, Bedane C, Vabres P, Truchetet F, Aubin F, Michel C, Jegou J, Grange F, Antonicelli F, Bernard P. Clinical and Immunologic Factors Associated With Bullous Pemphigoid Relapse During the First Year of Treatment: A Multicenter, Prospective Study. JAMA Dermatol. 2014 Jan 1;150(1):25–33.

[52] Fisler RE, Saeb M, Liang MG, Howard RM, McKee PH. Childhood bullous pemphigoid: a clinicopathologic study and review of the literature. Am J Dermatopathol. 2003 Juni;25(3):183–189.

[53] Foureur N, Mignot S, Senet P, Verpillat P, Picard-Dahan C, Crickx B, Labarre C, Nicaise-Roland P, Descamps V. [Correlation between the presence of type-2 anti-pemphigoid antibodies and dementia in elderly subjects with no clinical signs of pemphigoid]. Ann Dermatol Venereol. 2006 Mai;133(5 Pt 1):439–443.

[54] Fuertes de Vega I, Iranzo-Fernández P, Mascaró-Galy JM. Bullous pemphigoid: clinical practice guidelines. Actas Dermosifiliogr. 2014 Mai;105(4):328–346.

[55] Gambichler T, Segert H, Höxtermann S, Schmitz L, Altmeyer P, Teegen B. Neurological disorders in patients with bullous pemphigoid: clinical and experimental investigations. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 2015 Sep 1;29(9):1758–1762.

[56] Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA. Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. J. Invest. Dermatol. 1992 Sep;99(3):243–250.

[57] Giudice GJ, Emery DJ, Zelickson BD, Anhalt GJ, Liu Z, Diaz LA. Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. J. Immunol. 1993 Nov 15;151(10):5742–5750.

[58] Grattan CE. Evidence of an association between bullous pemphigoid and psoriasis. Br. J. Dermatol. 1985 Sep;113(3):281–283.

[59] Groves R, Schmidt E. Immunobullous diseases. In: Griffiths C, Barker J, Bleiker T, Chalmers R, Creamer D, herausgeber. Rook's Textbook of Dermatology. 9th edition. Wiley-Blackwell; 2016. p. 50.01-50.56.

[60] Gudi VS, White MI, Cruickshank N, Herriot R, Edwards SL, Nimmo F, Ormerod AD. Annual incidence and mortality of bullous pemphigoid in the Grampian Region of North-east Scotland. British Journal of Dermatology. 2005 Aug;153(2):424–427.

[61] Guo L, Degenstein L, Dowling J, Yu Q-C, Wollmann R, Perman B, Fuchs E. Gene targeting of BPAG1: Abnormalities in mechanical strength and cell migration in stratified epithelia and neurologic degeneration. Cell. 1995 Apr 21;81(2):233–243.

[62] Hachisuka H, Kurose K, Karashima T, Mori O, Maeyama Y. Serum from normal elderly individuals contains anti-basement membrane zone antibodies. Arch Dermatol. 1996 Okt;132(10):1201–1205.

[63] Hall RP, Murray JC, McCord MM, Rico MJ, Streilein RD. Rabbits immunized with a peptide encoded for by the 230-kD bullous pemphigoid antigen cDNA develop an enhanced inflammatory response to UVB irradiation: a potential animal model for bullous pemphigoid. J. Invest. Dermatol. 1993 Juli;101(1):9–14.

[64] Hall RP, Streilein RD, Hannah DL, McNair PD, Fairley JA, Ronaghy A, Edhegard KD, Levesque MC. Association of serum B-cell activating factor level and proportion of memory and transitional B cells with clinical response after rituximab treatment of bullous pemphigoid patients. J. Invest. Dermatol. 2013 Dez;133(12):2786–2788.

[65] Hashimoto T, Tsuruta D, Dainichi T, Hamada T, Furumura M, Ishii N. Demonstration of Epitope Spreading in Bullous Pemphigoid: Results of a Prospective Multicenter Study. Journal of Investigative Dermatology. 2011 Nov;131(11):2175–2177.

[66] Hayase Y, Tobita K. Influenza virus and neurological diseases. Psychiatry and Clinical Neurosciences. 1997 Aug 1;51(4):181–184.

[67] Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. The Lancet Neurology. 2015 Apr;14(4):406–419.

[68] Hirose M, Recke A, Beckmann T, Shimizu A, Ishiko A, Bieber K, Westermann J, Zillikens D, Schmidt E, Ludwig RJ. Repetitive Immunization Breaks Tolerance to Type XVII Collagen and Leads to Bullous Pemphigoid in Mice. The Journal of Immunology. 2011 Aug 1;187(3):1176–1183.

[69] Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? The Lancet Neurology. 2009 Apr;8(4):382–397.

[70] Hofmann S, Thoma-Uszynski S, Hunziker T, Bernard P, Koebnick C, Stauber A, Schuler G, Borradori L, Hertl M. Severity and phenotype of bullous pemphigoid relate

to autoantibody profile against the NH2- and COOH-terminal regions of the BP180 ectodomain. J. Invest. Dermatol. 2002 Nov;119(5):1065–1073.

[71] Hopkinson SB, Baker SE, Jones JC. Molecular genetic studies of a human epidermal autoantigen (the 180-kD bullous pemphigoid antigen/BP180): identification of functionally important sequences within the BP180 molecule and evidence for an interaction between BP180 and alpha 6 integrin. The Journal of cell biology. 1995;130(1):117–125.

[72] Hopkinson SB, Jones JCR. The N Terminus of the Transmembrane Protein BP180 Interacts with the N-terminal Domain of BP230, Thereby Mediating Keratin Cytoskeleton Anchorage to the Cell Surface at the Site of the Hemidesmosome. Molecular Biology of the Cell. 2000 Jan;11(1):277.

[73] Hübner F, Recke A, Zillikens D, Linder R, Schmidt E. Prevalence and Age Distribution of Pemphigus and Pemphigoid Diseases in Germany. J. Invest. Dermatol. 2016 Juli 25;

[74] Iwata H, Kitajima Y. Bullous pemphigoid: role of complement and mechanisms for blister formation within the lamina lucida. Experimental Dermatology. 2013 Juni;22(6):381–385.

[75] Iwata Y, Komura K, Kodera M, Usuda T, Yokoyama Y, Hara T, Muroi E, Ogawa F, Takenaka M, Sato S. Correlation of IgE autoantibody to BP180 with a severe form of bullous pemphigoid. Arch Dermatol. 2008 Jan;144(1):41–48.

[76] Jedlickova H, Hlubinka M, Pavlik T, Semradova V, Budinska E, Vlasin Z. Bullous pemphigoid and internal diseases - A case-control study. Eur J Dermatol. 2010 Feb;20(1):96–101.

[77] Joly P, Baricault S, Sparsa A, Bernard P, Bédane C, Duvert-Lehembre S, Courville P, Bravard P, Rémond B, Doffoel-Hantz V, Bénichou J. Incidence and Mortality of Bullous Pemphigoid in France. J Invest Dermatol. 2012 Aug;132(8):1998–2004.

[78] Joly P, Benichou J, Lok C, Hellot MF, Saiag P, Tancrede-Bohin E, Sassolas B, Labeille B, Doutre MS, Gorin I, Pauwels C, Chosidow O, Caux F, Estève E, Dutronc Y, Sigal M, Prost C, Maillard H, Guillaume JC, Roujeau JC. Prediction of survival for patients with bullous pemphigoid: a prospective study. Arch Dermatol. 2005 Juni;141(6):691–698.

[79] Joly P, Roujeau J-C, Benichou J, Picard C, Dreno B, Delaporte E, Vaillant L, D'Incan M, Plantin P, Bedane C, Young P, Bernard P, Bullous Diseases French Study Group. A comparison of oral and topical corticosteroids in patients with bullous pemphigoid. N. Engl. J. Med. 2002 Jan 31;346(5):321–327.

[80] Jung M, Kippes W, Messer G, Zillikens D, Rzany B. Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence. J. Am. Acad. Dermatol. 1999 Aug;41(2 Pt 1):266–268.

[81] Kamiya K, Aoyama Y, Suzuki T, Niwa H, Horio A, Nishio E, Tokura Y. Possible enhancement of BP180 autoantibody production by herpes zoster. J. Dermatol. 2016 Feb;43(2):197–199.

[82] Kárpáti S. Dermatitis herpetiformis. Clin. Dermatol. 2012 Feb;30(1):56–59.

[83] Kippes W, Schmidt E, Roth A, Rzany B, Bröcker EB, Zillikens D. [Immunopathologic changes in 115 patients with bullous pemphigoid]. Hautarzt. 1999 Dez;50(12):866–872.

[84] Kirtschig G, Chow ET, Venning VA, Wojnarowska FT. Acquired subepidermal bullous diseases associated with psoriasis: a clinical, immunopathological and immunogenetic study. Br. J. Dermatol. 1996 Nov;135(5):738–745.

[85] Kirtsching G, Walkden VM, Venning VA, Wojnarowskai F. Bullous pemphigoid and multiple sclerosis: a report of three cases and review of the literature. Clinical and Experimental Dermatology. 1995 Nov 1;20(6):449–453.

[86] Kiss M, Husz S, Jánossy T, Marczinovits I, Molnár J, Korom I, Dobozy A. Experimental bullous pemphigoid generated in mice with an antigenic epitope of the human hemidesmosomal protein BP230. J. Autoimmun. 2005 Feb;24(1):1–10.

[87] Koster J, Geerts D, Favre B, Borradori L, Sonnenberg A. Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin alpha6beta4 important for hemidesmosome assembly. J. Cell. Sci. 2003 Jan 15;116(Pt 2):387–399.

[88] Kromminga A, Scheckenbach C, Georgi M, Hagel C, Arndt R, Christophers E, Bröcker E-B, Zillikens D. Patients with Bullous Pemphigoid and Linear IgA Disease show a Dual IgA and IgG Autoimmune Response to BP180. Journal of Autoimmunity. 2000 Nov;15(3):293–300.

[89] Kromminga A, Sitaru C, Hagel C, Herzog S, Zillikens D. Development of an ELISA for the detection of autoantibodies to BP230. Clinical Immunology. 2004 Apr;111(1):146–152.

[90] Künzli K, Favre B, Chofflon M, Borradori L. One gene but different proteins and diseases: the complexity of dystonin and bullous pemphigoid antigen 1. Experimental Dermatology. 2016 Jan;25(1):10–16.

[91] Laffitte E, Burkhard PR, Fontao L, Jaunin F, Saurat J-H, Chofflon M, Borradori L. Bullous pemphigoid antigen 1 isoforms: potential new target autoantigens in multiple sclerosis? British Journal of Dermatology. 2005;152(3):537–540.

[92] Lamb PM, Abell E, Tharp M, Frye R, Deng J-S. Prodromal bullous pemphigoid. Int. J. Dermatol. 2006 März;45(3):209–214.

[93] Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. N. Engl. J. Med. 1998 Okt 8;339(15):1044–1053.

[94] Langan SM, Groves RW, West J. The relationship between neurological disease and bullous pemphigoid: a population-based case-control study. J. Invest. Dermatol. 2011 März;131(3):631–636.

[95] Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJP, West J. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. BMJ. 2008 Juli 9;337(jul09 1):a180–a180.

[96] Langer-Gould A, Albers K, Van Den Eeden S, Nelson L. Autoimmune diseases prior to the diagnosis of multiple sclerosis: a population-based case-control study. Multiple Sclerosis. 2010 Juli 1;16(7):855–861.

[97] de Lau LML, Breteler MMB. Epidemiology of Parkinson's disease. Lancet Neurol. 2006 Juni;5(6):525–535.

[98] Lazarova Z, Salato VK, Lanschuetzer CM, Janson M, Fairley JA, Yancey KB. IgG anti-laminin-332 autoantibodies are present in a subset of patients with mucous membrane, but not bullous, pemphigoid. Journal of the American Academy of Dermatology. 2008 Juni;58(6):951–958.

[99] Lazarova Z, Sitaru C, Zillikens D, Yancey KB. Comparative analysis of methods for detection of anti-laminin 5 autoantibodies in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid. J. Am. Acad. Dermatol. 2004 Dez;51(6):886–892.

[100] Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. Lancet. 2009 Juni 13;373(9680):2055–2066.

[101] Leung CL, Zheng M, Prater SM, Liem RKH. The BPAG1 locus. J Cell Biol. 2001 Aug 20;154(4):691–698.

[102] Li L, Chen J, Wang B, Yao Y, Zuo Y. Sera from patients with bullous pemphigoid (BP) associated with neurological diseases recognized BP antigen 1 in the skin and brain. British Journal of Dermatology. 2009 Juni 1;160(6):1343–1345.

[103] Lin MS, Fu CL, Giudice GJ, Olague-Marchan M, Lazaro AM, Stastny P, Diaz LA. Epitopes targeted by bullous pemphigoid T lymphocytes and autoantibodies map to the same sites on the bullous pemphigoid 180 ectodomain. J. Invest. Dermatol. 2000 Dez;115(6):955–961.

[104] Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, Giudice GJ. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. Journal of Clinical Investigation. 1993 Nov 1;92(5):2480–2488.

[105] Liu Z, Giudice GJ, Swartz SJ, Fairley JA, Till GO, Troy JL, Diaz LA. The role of complement in experimental bullous pemphigoid. Journal of Clinical Investigation. 1995 Apr 1;95(4):1539–1544.

[106] Liu Z, Shapiro SD, Zhou X, Twining SS, Senior RM, Giudice GJ, Fairley JA, Diaz LA. A critical role for neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid. J. Clin. Invest. 2000 Jan;105(1):113–123.

[107] Liu Z, Shipley JM, Vu TH, Zhou X, Diaz LA, Werb Z, Senior RM. Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid. J. Exp. Med. 1998 Aug 3;188(3):475–482.

[108] Liu Z, Zhou X, Shapiro SD, Shipley JM, Twining SS, Diaz LA, Senior RM, Werb Z. The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. Cell. 2000 Sep 1;102(5):647–655.

[109] Lloyd-Lavery A, Chi C-C, Wojnarowska F, Taghipour K. The associations between bullous pemphigoid and drug use: a UK case-control study. JAMA Dermatol. 2013 Jan;149(1):58–62.

[110] Lo Schiavo A, Ruocco E, Brancaccio G, Caccavale S, Ruocco V, Wolf R. Bullous pemphigoid: etiology, pathogenesis, and inducing factors: facts and controversies. Clin. Dermatol. 2013 Aug;31(4):391–399.

[111] Marazza G, Pham HC, Schärer L, Pedrazzetti PP, Hunziker T, Trüeb RM, Hohl D, Itin P, Lautenschlager S, Naldi L, Borradori L, Autoimmune bullous disease Swiss study group. Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study. Br. J. Dermatol. 2009 Okt;161(4):861–868.

[112] Masunaga T, Shimizu H, Yee C, Borradori L, Lazarova Z, Nishikawa T, Yancey KB. The extracellular domain of BPAG2 localizes to anchoring filaments and its carboxyl terminus extends to the lamina densa of normal human epidermal basement membrane. J. Invest. Dermatol. 1997 Aug;109(2):200–206.

[113] Messingham KAN, Aust S, Helfenberger J, Parker KL, Schultz S, McKillip J, Narayanan NS, Fairley JA. Autoantibodies to Collagen XVII Are Present in Parkinson's Disease and Localize to Tyrosine-Hydroxylase Positive Neurons. J. Invest. Dermatol. 2016 März;136(3):721–723.

[114] Nakatani C, Muramatsu T, Shirai T. Immunoreactivity of bullous pemphigoid (BP) autoantibodies against the NC16A and C-terminal domains of the 180 kDa BP antigen (BP180): immunoblot analysis and enzyme-linked immunosorbent assay using BP180 recombinant proteins. Br. J. Dermatol. 1998 Sep;139(3):365–370.

[115] Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Ujiie H, Nishimura M, Sawamura D, Shimizu H. Antibodies to pathogenic epitopes on type XVII collagen cause skin fragility in a complement-dependent and -independent manner. J. Immunol. 2012 Juni 1;188(11):5792–5799.

[116] Nishie W, Sawamura D, Goto M, Ito K, Shibaki A, McMillan JR, Sakai K, Nakamura H, Olasz E, Yancey KB, Akiyama M, Shimizu H. Humanization of autoantigen. Nature Medicine. 2007 März;13(3):378–383.

[117] Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. N. Engl. J. Med. 2000 Sep 28;343(13):938–952.

[118] Nutt JG, Wooten GF. Clinical practice. Diagnosis and initial management of Parkinson's disease. N. Engl. J. Med. 2005 Sep 8;353(10):1021–1027.

[119] Ogawa H, Sakuma M, Morioka S, Kitamura K, Sasai Y, Imamura S, Inaba Y. The incidence of internal malignancies in pemphigus and bullous pemphigoid in Japan. J. Dermatol. Sci. 1995 März;9(2):136–141.

[120] Oh DD, Zhao CY, Murrell DF. A review of case-control studies on the risk factors for the development of autoimmune blistering diseases. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2016 Apr;30(4):595–603.

[121] Ohata C, Ishii N, Koga H, Fukuda S, Tateishi C, Tsuruta D, Furumura M, Hashimoto T. Coexistence of autoimmune bullous diseases (AIBDs) and psoriasis: A series of 145 cases. J. Am. Acad. Dermatol. 2015 Juli;73(1):50–55.

[122] Pelegrí C, Canudas AM, del Valle J, Casadesus G, Smith MA, Camins A, Pallàs M, Vilaplana J. Increased permeability of blood-brain barrier on the hippocampus of a murine model of senescence. Mech. Ageing Dev. 2007 Sep;128(9):522–528.

[123] Perriard J, Jaunin F, Favre B, Budinger L, Hertl M, Saurat J-H, Borradori L. IgG Autoantibodies from Bullous Pemphigoid (BP) Patients Bind Antigenic Sites on Both the Extracellular and the Intracellular Domains of the BP Antigen 180. Journal of Investigative Dermatology. 1999 Feb;112(2):141–147.

[124] Pfendner EG, Lucky AW. Junctional Epidermolysis Bullosa. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJ, Bird TD, Fong C-T, Mefford HC, Smith RJ, Stephens K, herausgeber. GeneReviews(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.

[125] Powell AM, Sakuma-Oyama Y, Oyama N, Black MM. Collagen XVII/BP180: a collagenous transmembrane protein and component of the dermoepidermal anchoring complex. Clinical and Experimental Dermatology. 2005 Nov;30(6):682–687.

[126] Pradhan S, Andreasson K. Commentary: Progressive inflammation as a contributing factor to early development of Parkinson's disease. Exp. Neurol. 2013 März;241:148–155.

[127] Prüßmann J, Prüßmann W, Recke A, Rentzsch K, Juhl D, Henschler R, Müller S, Lamprecht P, Schmidt E, Csernok E, Görg S, Stöcker W, Zillikens D, Ibrahim SM, Ludwig RJ. Co-occurrence of autoantibodies in healthy blood donors. Experimental Dermatology. 2014 Juli 1;23(7):519–521.

[128] Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vécsei L, Milanov I. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. Eur. J. Neurol. 2006 Juli;13(7):700–722.

[129] Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. Lancet Neurol. 2010 Juli;9(7):727–739.

[130] Rose E, Kasperkiewicz M, Rose C, Zillikens D. Bulloese Autoimmundermatosen Neues zur Diagnostik und Therapie. Der Deutsche Dermatologe. 2007 Sep;617–23.

[131] Roujeau JC, Lok C, Bastuji-Garin S, Mhalla S, Enginger V, Bernard P. High risk of death in elderly patients with extensive bullous pemphigoid. Arch Dermatol. 1998 Apr;134(4):465–469.

[132] Roussel A, Benichou J, Randriamanantany ZA, Gilbert D, Drenovska K, Houivet E, Tron F, Joly P. Enzyme-linked immunosorbent assay for the combination of bullous pemphigoid antigens 1 and 2 in the diagnosis of bullous pemphigoid. Arch Dermatol. 2011 März;147(3):293–298.

[133] Ruhrberg C, Watt FM. The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture. Curr. Opin. Genet. Dev. 1997 Juni;7(3):392–397.

[134] Russo I, Saponeri A, Peserico A, Alaibac M. The use of biochip immunofluorescence microscopy for the diagnosis of Pemphigus vulgaris. Acta Histochem. 2014 Juni;116(5):713–716.

[135] Rzany B, Partscht K, Jung M, Kippes W, Mecking D, Baima B, Prudlo C, Pawelczyk B, Messmer EM, Schuhmann M, Sinkgraven R, Büchner L, Büdinger L, Pfeiffer C, Sticherling M, Hertl M, Kaiser H-W, Meurer M, Zillikens D, Messer G. Risk factors for lethal outcome in patients with bullous pemphigoid: low serum albumin level, high dosage of glucocorticosteroids, and old age. Arch Dermatol. 2002 Juli;138(7):903–908.

[136] Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. Lancet. 2004 Mai 29;363(9423):1783–1793.

[137] Sanchez‐Guajardo V, Barnum CJ, Tansey MG, Romero‐Ramos M. Neuroimmunological processes in Parkinson's disease and their relation to α-synuclein: microglia as the referee between neuronal processes and peripheral immunity. ASN NEURO. 2013 Apr 30;5(2):113–139.

[138] Sárdy M, Kárpáti S, Merkl B, Paulsson M, Smyth N. Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. J. Exp. Med. 2002 März 18;195(6):747–757.

[139] Sawamura D, Li K, Chu ML, Uitto J. Human bullous pemphigoid antigen (BPAG1). Amino acid sequences deduced from cloned cDNAs predict biologically important peptide segments and protein domains. J. Biol. Chem. 1991 Sep 25;266(27):17784–17790.

[140] Schmidt E, Goebeler M, Hertl M, Sárdy M, Sitaru C, Eming R, Hofmann SC, Hunzelmann N, Kern JS, Kramer H, Orzechowski H-D, Pfeiffer C, Schuster V, Sporbeck B, Sticherling M, Worm M, Zillikens D, Nast A. S2k guideline for the diagnosis of pemphigus vulgaris/foliaceus and bullous pemphigoid. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. 2015 Juli 1;13(7):713–727.

[141] Schmidt E, Obe K, Bröcker EB, Zillikens D. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. Arch Dermatol. 2000 Feb;136(2):174–178.

[142] Schmidt E, Reimer S, Kruse N, Jainta S, Brocker E-B, Marinkovich MP, Giudice GJ, Zillikens D. Autoantibodies to BP180 Associated with Bullous Pemphigoid Release Interleukin-6 and Interleukin-8 from Cultured Human Keratinocytes. Journal of Investigative Dermatology. 2000 Nov;115(5):842–848.

[143] Schmidt E, Zillikens D. Pemphigoid diseases. The Lancet. 2013 Feb 1;381(9863):320–332.

[144] Schmidt E, Zillikens D. The diagnosis and treatment of autoimmune blistering diseases. Dtsch Arztebl. 2011;108(23):399–405.

[145] Schmidt E, Zillikens D. Diagnosis and clinical severity markers of bullous pemphigoid. F1000 Med Rep. 2009;1.

[146] Schmidt E, Zillikens D. Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. Autoimmun Rev. 2010 Dez;10(2):84–89.

[147] Schmidt E, Zillikens D. Immunoadsorption in dermatology. Archives of Dermatological Research. 2010 Mai;302(4):241–253.

[148] Schmidt T, Sitaru C, Amber K, Hertl M. BP180- and BP230-specific IgG autoantibodies in pruritic disorders of the elderly: a preclinical stage of bullous pemphigoid? Br. J. Dermatol. 2014 Aug;171(2):212–219.

[149] Schulze DF, Kasperkiewicz M, Zillikens D, Schmidt E. Bullöses Pemphigoid. Hautarzt. 2013 Dez 1;64(12):931–945.

[150] Schulze F, Neumann K, Recke A, Zillikens D, Linder R, Schmidt E. Malignancies in Pemphigus and Pemphigoid Diseases. J Invest Dermatol. 2015 Mai 1;135(5):1445–1447.

[151] Schulze FS, Beckmann T, Nimmerjahn F, Ishiko A, Collin M, Köhl J, Goletz S, Zillikens D, Ludwig R, Schmidt E. Fcγ receptors III and IV mediate tissue destruction in a novel adult mouse model of bullous pemphigoid. Am. J. Pathol. 2014 Aug;184(8):2185–2196.

[152] Schwartz M, Baruch K. Breaking peripheral immune tolerance to CNS antigens in neurodegenerative diseases: boosting autoimmunity to fight-off chronic neuroinflammation. J. Autoimmun. 2014 Nov;54:8–14.

[153] Schwartz M, Raposo C. Protective Autoimmunity: A Unifying Model for the Immune Network Involved in CNS Repair. Neuroscientist. 2014 Jan 6;20(4):343–358.

[154] Schwieger-Briel A, Moellmann C, Mattulat B, Schauer F, Kiritsi D, Schmidt E, Sitaru C, Ott H, Kern JS. Bullous pemphigoid in infants: characteristics, diagnosis and treatment. Orphanet J Rare Dis. 2014;9:185.

[155] Scofield RH. Autoantibodies as predictors of disease. Lancet. 2004 Mai 8;363(9420):1544–1546.

[156] Seppänen A. Collagen XVII: a shared antigen in neurodermatological interactions? Clin. Dev. Immunol. 2013;2013:240570.

[157] Seppänen A, Autio-Harmainen H, Alafuzoff I, Särkioja T, Veijola J, Hurskainen T, Bruckner-Tuderman L, Tasanen K, Majamaa K. Collagen XVII is expressed in human CNS neurons. Matrix Biol. 2006 Apr;25(3):185–188.

[158] Seppänen A, Miettinen R, Alafuzoff I. Neuronal collagen XVII is localized to lipofuscin granules: NeuroReport. 2010 Dez;21(17):1090–1094.

[159] Seppänen A, Suuronen T, Hofmann SC, Majamaa K, Alafuzoff I. Distribution of collagen XVII in the human brain. Brain Res. 2007 Juli 16;1158:50–56.

[160] Shimanovich I, Mihai S, Oostingh GJ, Ilenchuk TT, Bröcker E-B, Opdenakker G, Zillikens D, Sitaru C. Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. J. Pathol. 2004 Dez;204(5):519–527.

[161] Sitaru C, Dähnrich C, Probst C, Komorowski L, Blöcker I, Schmidt E, Schlumberger W, Rose C, Stöcker W, Zillikens D. Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies. Exp. Dermatol. 2007 Sep;16(9):770–777.

[162] Sitaru C, Schmidt E, Petermann S, Munteanu LS, Bröcker E-B, Zillikens D. Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal–epidermal separation in cryosections of human skin. Journal of investigative dermatology. 2002;118(4):664–671.

[163] Skaria M, Jaunin F, Hunziker T, Riou S, Schumann H, Bruckner-Tuderman L, Hertl M, Bernard P, Saurat J-H, Favre B, Borradori L. IgG Autoantibodies from Bullous Pemphigoid Patients Recognize Multiple Antigenic Reactive Sites Located Predominantly Within the B and C Subdomains of the COOH-Terminus of BP230. Journal of Investigative Dermatology. 2000 Mai;114(5):998–1004.

[164] Stanley JR, Hawley-Nelson P, Yuspa SH, Shevach EM, Katz SI. Characterization of bullous pemphigoid antigen: A unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. Cell. 1981 Juni;24(3):897–903.

[165] Sticherling M, Erfurt-Berge C. Autoimmune blistering diseases of the skin. Autoimmun Rev. 2012 Jan;11(3):226–230.

[166] Stinco G, Codutti R, Scarbolo M, Valent F, Patrone P. A retrospective epidemiological study on the association of bullous pemphigoid and neurological diseases. Acta Derm. Venereol. 2005;85(2):136–139.

[167] Taghipour K, Chi C-C, Bhogal B, Groves RW, Venning V, Wojnarowska F. Immunopathological characteristics of patients with bullous pemphigoid and neurological disease. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 2014 Mai;28(5):569–573.

[168] Taghipour K, Chi C-C, Vincent A, Groves RW, Venning V, Wojnarowska F. The Association of Bullous Pemphigoid With Cerebrovascular Disease and Dementia: A Case-Control Study. Arch Dermatol. 2010 Nov 15;146(11):1251–1254.

[169] Taghipour K, Kirtschig G, Palace J, Groves RW, Venning V, Wojnarowska F. The association of multiple sclerosis with bullous pemphigoid: Is there a shared antigen

response? Journal of the American Academy of Dermatology. 2012 Juli;67(1):160–161.

[170] Tampoia M, Giavarina D, Di Giorgio C, Bizzaro N. Diagnostic accuracy of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) to detect anti-skin autoantibodies in autoimmune blistering skin diseases: a systematic review and meta-analysis. Autoimmun Rev. 2012 Dez;12(2):121–126.

[171] Tampoia M, Zucano A, Villalta D, Antico A, Bizzaro N. Anti-skin specific autoantibodies detected by a new immunofluorescence multiplex biochip method in patients with autoimmune bullous diseases. Dermatology. 2012;225(1):37–44.

[172] Teixeira VB, Cabral R, Brites MM, Vieira R, Figueiredo A. Bullous pemphigoid and comorbidities: a case-control study in Portuguese patients. Anais Brasileiros de Dermatologia. 2014 Apr;89(2):274.

[173] Thoma-Uszynski S, Uter W, Schwietzke S, Schuler G, Borradori L, Hertl M. Autoreactive T and B cells from bullous pemphigoid (BP) patients recognize epitopes clustered in distinct regions of BP180 and BP230. J. Immunol. 2006 Feb 1;176(3):2015–2023.

[174] Toosy A, Ciccarelli O, Thompson A. Symptomatic treatment and management of multiple sclerosis. Handb Clin Neurol. 2014;122:513–562.

[175] della Torre R, Combescure C, Cortés B, Marazza G, Beltraminelli H, Naldi L, Borradori L. Clinical presentation and diagnostic delay in bullous pemphigoid: a prospective nationwide cohort. Br. J. Dermatol. 2012 Nov;167(5):1111–1117.

[176] Ujiie H, Sasaoka T, Izumi K, Nishie W, Shinkuma S, Natsuga K, Nakamura H, Shibaki A, Shimizu H. Bullous pemphigoid autoantibodies directly induce blister formation without complement activation. J. Immunol. 2014 Nov 1;193(9):4415–4428.

[177] Vanderlugt CJ, Miller SD. Epitope spreading. Curr. Opin. Immunol. 1996 Dez;8(6):831–836.

[178] Vanderlugt CL, Miller SD. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. Nature Reviews Immunology. 2002 Feb 1;2(2):85.

[179] Venning VA, Wojnarowska F. Induced bullous pemphigold. British Journal of Dermatology. 1995 Mai 1;132(5):831–832.

[180] Venning VA, Wojnarowska F. The association of bullous pemphigoid and malignant disease: a case control study. British Journal of Dermatology. 1990 Okt 1;123(4):439–445.

[181] Walmsley N, Hampton P. Bullous pemphigoid triggered by swine flu vaccination: case report and review of vaccine triggered pemphigoid. J Dermatol Case Rep. 2011 Dez 12;5(4):74–76.

[182] Wever S, Rank C, Hornschuh B, Hashimoto T, Nishikawa T, Bröcker EB, Zillikens D. [Bullous pemphigoid simulation subacute simple prurigo]. Hautarzt. 1995 Nov;46(11):789–795.

[183] Wieland CN, Comfere NI, Gibson LE, Weaver AL, Krause PK, Murray JA. Anti-bullous pemphigoid 180 and 230 antibodies in a sample of unaffected subjects. Arch Dermatol. 2010 Jan;146(1):21–25.

[184] Wilczek A, Sticherling M. Concomitant psoriasis and bullous pemphigoid: coincidence or pathogenic relationship? Int. J. Dermatol. 2006 Nov;45(11):1353–1357.

[185] Wingerchuk DM, Weinshenker BG. Disease modifying therapies for relapsing multiple sclerosis. BMJ. 2016;354:i3518.

[186] Wolz MM, Comfere NI, Gibson LE, Wieland CN. Anti-bullous pemphigoid 180 and 230 antibodies in asymptomatic subjects: Five-year follow-up. Journal of the American Academy of Dermatology. 2013 Apr;68(4):686–687.

[187] Yoshida M, Hamada T, Amagai M, Hashimoto K, Uehara R, Yamaguchi K, Imamura K, Okamoto E, Yasumoto S, Hashimoto T. Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. Journal of Dermatological Science. 2006 Jan;41(1):21–30.

[188] Yu KK, Crew AB, Messingham KAN, Fairley JA, Woodley DT. Omalizumab therapy for bullous pemphigoid. J. Am. Acad. Dermatol. 2014 Sep;71(3):468–474.

[189] Yu X, Holdorf K, Kasper B, Zillikens D, Ludwig RJ, Petersen F. FcγRIIA and FcγRIIIB Are Required for Autoantibody-Induced Tissue Damage in Experimental Human Models of Bullous Pemphigoid. Journal of Investigative Dermatology. 2010 Dez;130(12):2841–2844.

[190] Zarian H, Saponeri A, Michelotto A, Zattra E, Belloni-Fortina A, Alaibac M. Biochip technology for the serological diagnosis of bullous pemphigoid. ISRN Dermatol. 2012;2012:237802.

[191] Zeevi N, Pachter J, McCullough LD, Wolfson L, Kuchel GA. The blood-brain barrier: geriatric relevance of a critical brain-body interface. J Am Geriatr Soc. 2010 Sep;58(9):1749–1757.

[192] Zhao CY, Murrell DF. Advances in understanding and managing bullous pemphigoid. F1000Res. 2015;4.

[193] Zillikens D, Wever S, Roth A, Weidenthaler-Barth B, Hashimoto T, Bröcker E-B. Incidence of Autoimmune Subepidermal Blistering Dermatoses in a Region of Central Germany. Arch Dermatol. 1995 Aug 1;131(8):957–958.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
˚C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
AK	Antikörper
APS	Ammonium Persulfate
Aqua dest.	Aqua destillata
BP	Bullöses Pemphigoid
BPAG	Bullöses Pemphigoid-Antigen
CD	Cluster of Differentiation
CI	Konfidenzintervall
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EU	Euroimmun
Fc	crystallisable fragment
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
gC	globuläre C-Domäne
HaCaT	Humane Keratinozyten Zell-Linie
HEK	Human Embryonic Kidney
HLA	Histokompatibilitätsantigen
HRP	Horseradish Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
kDa	Kilodalton

L	Liter
LAD-1	Lineare-IgA-Dermatose Antigen 1
Lam	Laminin
LAMA3	Laminin α-3
m	männlich
M	Molare Masse
mA	Milliampere
MAO	Monoaminooxidase
ml	Milliliter
MPC	Medizinisches Proteom Center
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl
n.d.	nicht durchgeführt
n.v.	nicht vorhanden
NaCl	Natriumchlorid
neg	negativ
NHS	Normales humanes Serum
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OR	Odds Ratio
Öso	Ösophagus
Pat.-ID.	Patienten-Identifikationsnummer
PBS	Phosphate buffered saline
PK	Positivkontrolle
pos	positiv
Re	relative Einheiten

SDS	Sodium-Dodecylsulfat
Sp	Spalthaut
Tab	Tabelle
TBST	Tris-buffered saline plus tween puffer
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TH	Tyrosin-Hydroxylase
U	Unit
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
UV	Ultraviolett
V	Volt
w	weiblich
WB	Westernblot
fl	full-length
ZNS	Zentrales Nervensystem

9.2 Material

❖ **Geräte und Hilfsmittel**

Name	Hersteller
8-fach Pipette (Research)	Eppendorf AG, Hamburg
Abzug captairchem	Erlab Laboreinrichtungen GmbH, Köln
Analysenwaage Analytical Plus	Ohaus Corporation, New Jersey, USA
Bio Vortex V1	Lab4you GmbH, Berlin
Blot-Kammer Mini Trans-Blot Cell and Systems	Bio-Rad Laboratories GmbH, München Enthält: 4 Gel-Systeme mit 5 Kämmen, 4 Paar Glasplatten+ Spacer, 2 Ständer, 4 Glashalterungen, Tank, Deckel, 2 Dichtungen
Blot-Schale	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
DAKO Cytomation Pen	Biozol, Eching
Elektrische Feinwaage PT 150	Sartorius AG, Göttingen
Elektrophoresekammer Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
ELISA-Reader	Opsys MR, Dynex Technologies GmbH, Denkendorf
Eppendorfpipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Fibrepad	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss MicroImaging
Gelkassetten	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glasplatten Glass Plates, Mini Protean 3 system, Short Plates	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kassette	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Laborwecker	Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Lineal	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Magnetrührer	Keison Products, Chelmsford, England
Magnetrührer IKA® RH basic 2	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Objektträgerkasten	Hassa, Lübeck
Pinzette	Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Pipettierhilfe, pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Power Supply-EPS 3500	Pharmacia
Reagenzträger/Pipettierhilfe	Euroimmun, Lübeck
Rotlicht	Kindermann GmbH, Ochsenfurt
Schüttler Taumler Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH&Co. KG, Schwabach, Deutschland
Schüttler Certomat IS	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Spacer Spacer Plates W/0,75mm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermostat 5320	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Transferkammer Mini-Protean Tetra Companion Running Module	Bio-Rad Laboratories GmbH, München Enthält: Tank, Deckel, Mini Trans-Blot

	module, Electrode assembly.companion running module
Wanne	Hindrex, Wuppertal
Westernblot-Inkubationsschälchen Biorad Mini-Incubation Trays	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

- **Chemikalien und Reagenzien**

Name	**Hersteller**
Acrylamid 4K-Lösung (30%)-Mix 49:1	Appli Chem GmbH, Darmstadt
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH+ Co. KG, Karlsruhe
Ammonium Persulfate (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Aqua dest.	Apotheke UKSH, Campus Lübeck
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck KGaA, Darmstadt
ECL Plus (Westernblotting Detection System) Amersham TM	GE Healthcare, UK
Entwickler	AG FA-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Essigsäure	Carl Roth GmbH+ Co. KG, Karlsruhe
Ethanol 70%	Apotheke UKSH, Campus Lübeck
Ethylendinitrilotetraessigsaure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Fast green	Merck KGaA, Darmstadt
Fixierer	AG FA-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Glycerin (wasserfrei zur Analyse)	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol (100%)	Carl Roth GmbH+ Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH+ Co. KG, Karlsruhe
Magermilchpulver	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Carl Roth GmbH+ Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenohosphat (NaH_2PO_4)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)-Tabletten	Merck KGaA, Darmstadt
Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman GmbH, Kassel
Phosphorsäure (H_3PO_4)	Merck KGaA,Darmstadt

Salzsäure 32% (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt
Tetramethylethylendiamine (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris-Base	Merck KGaA , Darmstadt
Tween 20	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn

- **Verbrauchsmaterialien**

Name	**Hersteller**
Amersham Hyperfilm TM ECL	GE Healthcare Europe GmbH, München
Biosphere® Filter Tips 100-1000µl, 2-200µl	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Einmal-Skalpell	Feather, Japan
Eis	Apotheke UKSH, Campus Lübeck
Eppendorftubes Safe Seal Gefäß 1,5ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Falconröhrchen 15ml, 50ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Filterpapier Chromatographiepapier	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Gelloader-Spitzen	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Handschuhe	Peha-soft, Heidenheim
Objektträger Superfrost	Menzel, Braunschweig
Proteinmarker BenchMark TM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Spectra Multicolor Broad Range Protein	Fermentas GmbH

- **Sonstiges**

Name	**Hersteller**
Anti-Human IgG-AFF-FITC	Binding Site, Birmingham, UK
Anti-LAMA3, C-terminaler Antikörper, polyklonales Kaninchen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München

Anti-Laminin α-3-Antikörper (H-187) polyklonales Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Laminin β-3-Antikörper (H-300), polyklonales Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Laminin γ-2-Antikörper (E6), monoklonales Maus IgG_1	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Bench Mark TM Protein Ladder	Invitrogen GmbH, Technologiepark, Karlsruhe
ELISA-Kit (EU) Euroimmun BP 180-NC16A-4X-ELISA (IgG)	Euroimmun, Lübeck
ELISA-Kit (EU) Euroimmun BP 230-CF-ELISA (IgG)	Euroimmun, Lübeck
Kaninchen-Anti-Maus IgG-HRP	Dako, Hamburg
Maus Anti-Human IgG_4-HRP (Clone HP 6025)	Southern Biotech vertrieben von Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Sheep-anti-human IgG-FITC	Bio-Rad Laboratories GmbH , München
Ziege-Anti-Kaninchen IgG-HRP	Dako, Hamburg
BIOCHIP®-Mosaik-Kit	Euroimmun, Lübeck

9.3 Ergebnisse aller Seren

Tab. 8.1: Ergebnisse der Kohorte A1

	ELISA		WB	BIOCHIP®-Mosaik						IIF	
Pat.-ID	BP 180	BP230	Lam 332	Öso	Sp	BP180 NC16a	BP180 fl	BP230 gC	BP230 fl	Öso	Sp
1/154	2,4	15,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
2/024	<1	5,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
3/006	<1	13,7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
4/020	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
6/066	14,2	13,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
7/010	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
8/278	<1	11,0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
9/043	2,9	18,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
10/275	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
11/071	<1	26,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
12/269	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
13/008	10,1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
14/208	<1	5,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
15/039	3,5	7,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
16/069	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

17/058	<1	4,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
18/110	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
19/137	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
20/035	<1	3,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
21/262	<1	4,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
22/017	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
23/219	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
24/123	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
25/084	<1	2,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
26/201	<1	12,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
27/090	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
28/176	4,1	11,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
29/003	<1	8,0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
30/238	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
31/180	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
32/190	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
33/053	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
34/220	<1	3,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
35/005	<1	4,0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.
36/025	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
37/078	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
38/291	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
39/028	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
40/312	5,0	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
41/007	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
43/056	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
44/505	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
45/111	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
46/378	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
47/404	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
48/356	<1	5,7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
49/087	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
50/384	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
51/400	<1	9,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
52/335	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
53/408	<1	5,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
54/288	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
55/325	<1	3,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
56/218	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
57/255	3,3	3,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
58/263	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.
59/379	6,2	2,7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
60/315	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
61/346	3,1	15,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.

62/093	4,4	9,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
63/075	2,7	4,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
64/352	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
65/580	4,2	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.
66/042	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
67/362	<1	3,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
68/036	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
69/122	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
70/022	<1	4,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
71/151	2,1	5,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
72/097	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
73/398	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
74/063	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
75/150	5,7	10,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
76/331	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
77/661	<1	4,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.

Pat.-ID= Patienten-Identifikationsnummer; WB= Westernblot; Lam 332= Laminin 332; Öso= Ösophagus; Sp= Spalthaut; fl= full-length; gC= globuläre C-Domäne; IIF= indirekte Immunfluoreszenz; neg= negativ; n.d. = nicht durchgeführt

Tab. 8.2: Ergebnisse der Kohorte C

	ELISA		**WB**	**BIOCHIP®-Mosaik**						**IIF**	
Pat.-ID	**BP 180**	**BP230**	**Lam 332**	**Öso**	**Sp**	**BP180 NC16a**	**BP180 fl**	**BP230 gC**	**BP230 fl**	**Sp**	**Öso**
N1	<1	2,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N2	<1	8,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N3	<1	5,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N4	9,7	7,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N5	58,9	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
N6	<1	9,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N7	<1	6,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N8	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
N9	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N10	3,3	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N11	3,1	2,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N12	<1	4,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N13	<1	2,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N14	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N15	<1	3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N16	<1	2,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N17	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N18	<1	15,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N19	<1	2,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N20	13,9	14,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N21	<1	6,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N22	8,5	10,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N23	<1	5,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

N24	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N25	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
N26	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N27	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N28	3,7	3,7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N29	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N30	12,9	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N31	<1	5,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N32	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N33	3,9	14,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N34	<1	3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N35	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N36	<1	6,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N37	3,2	3,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N38	<1	25,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
N39	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N40	2,6	15,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N41	<1	<1	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg
N42	3,1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.
N43	<1	18,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N44	<1	10,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N45	<1	14,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N46	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N47	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N48	<1	10,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N49	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
N50	<1	8,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.

Pat.-ID= Patienten-Identifikationsnummer; WB= Westernblot; Lam 332= Laminin 332; Öso= Ösophagus; Sp= Spalthaut; fl= full-length; gC= globuläre C-Domäne; IIF= indirekte Immunfluoreszenz; neg= negativ; pos= positiv; n.d. = nicht durchgeführt

Tab. 8.3: Ergebnisse der Kohorte A2

	ELISA		**WB**	**BIOCHIP®-Mosaik**						**IIF**	
Pat.-ID	**BP 180**	**BP230**	**Lam 332**	**Öso**	**Sp**	**BP180 NC16a**	**BP180 fl**	**BP230 gC**	**BP230 fl**	**Öso**	**Sp**
1/167	<1	2,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
2/239	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
3/297	<1	6,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
4/142	<1	2,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6/027	<1	14,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
7/205	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
8/051	<1	10,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
9/302	<1	3,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
10/222	<1	2,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
11/114	<1	7,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
12/175	5,4	18,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.

13/216	<1	2,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
14/181	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
15/270	<1	7,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
16/268	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
17/158	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
18/260	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
19/085	<1	4,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
20/183	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
21/432	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
22/199	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
23/182	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
24/046	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
25/023	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
26/212	7,2	5,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
27/209	5,2	13,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
28/162	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
29/050	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
30/160	13,3	11,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
31/130	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
32/161	<1	3,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
33/106	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
34/178	<1	4,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
35/129	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
36/174	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
37/125	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
38/068	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
39/348	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
40/143	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
41/105	23,4	4,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
43/252	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
44/168	3,2	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
45/456	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
46/285	<1	4,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
47/253	<1	3,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
48/185	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.
49/240	<1	2,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
50/171	4,2	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
51/116	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
52/391	<1	11,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
53/365	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
54/202	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
55/396	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
56/274	5,4	6,7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
57/247	5,0	3,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.

58/307	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
59/144	76,5	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
60/254	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
61/159	<1	2,7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
62/163	11,5	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
63/453	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
64/392	<1	3,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
65/191	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
66/221	30,9	3,5	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg
67/092	<1	2,7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
68/363	4,3	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
69/234	<1	<1	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg
70/164	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
71/227	45,5	10,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
72/230	<1	8,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
73/113	<1	5,0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
74/265	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
75/203	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
76/345	16,5	10,7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
77/195	<1	5,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.

Pat.-ID= Patienten-Identifikationsnummer; WB= Westernblot; Lam 332= Laminin 332; Öso= Ösophagus; Sp= Spalthaut; fl= full-length; gC= globuläre C-Domäne; IIF= indirekte Immunfluoreszenz; neg= negativ; pos= positiv; n.d. = nicht durchgeführt

Tab. 8.4: Ergebnisse der Kohorte A3

	ELISA		**WB**	**BIOCHIP®-Mosaik**						**IIF**	
Pat.-ID	**BP180**	**BP230**	**Lam 332**	**Öso**	**Sp**	**BP180 NC16a**	**BP180 fl**	**BP230 gC**	**BP230 fl**	**Sp**	**Öso**
1/276	3,8	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
2/152	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
3/086	9,2	7,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
4/244	<1	11,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
6/108	2,9	17,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
7/135	<1	3,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
8/287	<1	12,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
9/173	<1	4,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
10/094	<1	6,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
11/166	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
12/029	<1	3,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
13/089	<1	9,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
14/228	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
15/047	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
16/057	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
17/193	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
18/096	2,5	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
19/080	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.

20/200	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
21/264	2,8	5,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
22/124	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
23/055	<1	2,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
24/098	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
25/136	<1	3,0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
26/148	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
27/289	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
28/294	<1	7,4	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg
29/067	3,7	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
30/303	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
31/246	<1	2,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
32/104	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
33/249	<1	9,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
34/074	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
35/204	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
36/353	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
37/128	<1	46,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
38/333	<1	13,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
39/319	<1	2,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
40/343	<1	<1	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg
41/626	4,6	8,8	neg	neg		neg	neg	neg	neg	neg	neg
43/380	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
44/377	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
45/394	<1	6,0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
46/115	<1	8,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
47/332	<1	4,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
48/076	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
49/412	<1	9,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
50/099	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
51/033	<1	5,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
52/031	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
53/344	<1	6,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
54/313	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.
55/401	2,12	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
56/410	2,3	4,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
57/351	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
58/236	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.
59/189	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
60/177	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
61/310	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
62/281	7,3	9,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
63/224	<1	2,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
64/385	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.

65/506	3,1	7,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
66/293	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.
67/284	35,6	29,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
68/376	4,344	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
69/250	<1	6,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
70/389	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
71/026	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
72/409	4,6	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
73/198	<1	4,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
74/235	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
75/407	<1	2,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
76/044	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
77/630	<1	4,7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.

Pat.-ID= Patienten-Identifikationsnummer; WB= Westernblot; Lam 332= Laminin 332; Öso= Ösophagus; Sp= Spalthaut; fl= full-length; gC= globuläre C-Domäne; IIF= indirekte Immunfluoreszenz; neg= negativ; pos= positiv; n.d. = nicht durchgeführt

Tab. 8.5: Ergebnisse der Kohorte B

	ELISA		**WB**	**BIOCHIP®-Mosaik**						**IIF**	
Pat.-ID	**BP180**	**BP230**	**Lam 332**	**Öso**	**Sp**	**BP180 NC16a**	**BP180 fl**	**BP230 gC**	**BP230 fl**	**Sp**	**Öso**
A1	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A2	<1	4,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A3	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A4	13,3	11,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A5	<1	6,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.
A6	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A7	20,9	51	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
A8	<1	6,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A9	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A10	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A11	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A12	2,3	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A13	2,5	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A14	<1	4,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A15	<1	14,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A16	4,1	4,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A17	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A18	2,8	15,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A19	4,5	48,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A20	<1	5,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A21	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A22	3,5	6,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A23	6,5	39,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A24	2,9	15,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A25	8,6	19,7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.

A26	<1	5,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A27	<1	8,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A28	<1	4,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A29	5,9	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A30	<1	4,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A31	<1	5,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A32	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A33	7,6	5,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A34	<1	4,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A35	<1	7,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A36	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A37	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A38	<1	3,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A39	<1	5,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A40	5,3	10,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A41	4,9	2,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A42	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A43	<1	5,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A44	<1	6,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A45	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A46	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A47	2,8	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A48	<1	2,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A49	<1	7,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A50	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A51	3,3	22,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A52	12,7	13,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A53	<1	40,0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
A54	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
A55	<1	5,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A56	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A57	<1	2,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A58	2,3	4,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A59	<1	13,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A60	6,5	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A61	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A62	<1	2,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A63	<1	7,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
A64	<1	11,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
A65	4,2	9,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.

Pat.-ID= Patienten-Identifikationsnummer; WB= Westernblot; Lam 332= Laminin 332; Öso= Ösophagus; Sp= Spalthaut; fl= full-length; gC= globuläre C-Domäne; IIF= indirekte Immunfluoreszenz; neg= negativ; pos= positiv; n.d. = nicht durchgeführt

Tab. 8.6: Ergebnisse der Kohorte D

	ELISA		WB	BIOCHIP®-Mosaik						IIF	
Pat.-ID	BP180	BP230	Lam 332	Öso	Sp	BP180 NC16a	BP180 fl	BP230 gC	BP230 fl	Sp	Öso
B1	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B2	5,9	6,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B3	<1	6,5	neg	neg	SP n.v.	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.
B4	<1	4,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B5	5,9	12,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B6	<1	4,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B7	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B8	<1	2,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B9	17,7	4,8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B10	<1	7,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B11	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B12	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B13	<1	8,5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B14	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B15	<1	5,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B16	9,8	6,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B17	8,9	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B18	<1	2,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B19	5,3	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B20	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B21	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B22	<1	3,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B23	<1	2,7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B24	4,4	6,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B25	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.
B26	2,2	9,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B27	<1	5,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B28	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B29	2,7	2,9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B30	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B31	3,6	3,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B32	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B33	9,5	10,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B34	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B35	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B36	7,6	5,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B37	5,8	7,6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B38	4,2	2,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B39	4,9	4,4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B40	8,8	11,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B41	4,7	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.

B42	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B43	<1	0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B44	3,9	3,1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B45	5,6	6,3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B46	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B47	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B48	<1	6,2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B49	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
B51	<1	<1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.

Pat.-ID= Patienten-Identifikationsnummer; WB= Westernblot; Lam 332= Laminin 332; Öso= Ösophagus; Sp= Spalthaut; fl= full-length; gC= globuläre C-Domäne; IIF= indirekte Immunfluoreszenz; neg= negativ; n.d. = nicht durchgeführt; n.v. = nicht vorhanden

10 Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. E. Schmidt möchte ich für die Möglichkeit zur Promotion, Überlassung des Themas und Unterstützung bei Durchführung der Arbeit ganz herzlich danken.

Mein Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. med. D. Zillikens, Direktor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck, für die Möglichkeit, die Dissertation in seiner Klinik durchführen zu können.

Ich möchte mich bei Frau Dr. med. F. Hübner und insbesondere Herrn Dr. med. A. Recke für die zahlreichen Anregungen und Denkanstöße sowie die Unterstützung bei der Auswertung und Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. med. J. Graf und Herrn PD Dr. med. J. Hagenah aus der Klinik für Neurologie der Universität zu Lübeck, Frau Dr. C. May aus dem Medizinischem Proteom-Center der Ruhr-Universität Bochum, Herrn. Prof. Dr. med. D. Woitalla aus der Klinik für Neurologie der Katholischen Kliniken Ruhrhalbinsel gGmbH sowie Frau Dr. med. A. Salmen und Herrn Prof. Dr. med. R. Gold aus der Klinik für Neurologie des St. Josef Hospital der Ruhr-Universität Bochum für die Bereitstellung der Seren bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ebenso gebührt mein Dank Herrn K. Fechner und Herrn Dr. W. Schlumberger von Euroimmun, Lübeck, für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der BIOCHP®-Mosaike.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Translation“ für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor sowie die vielen Ratschläge und Hilfestellungen. Mein besonderer Dank gilt Frau V. Krull für ihre unerschöpfliche Geduld und Hilfsbereitschaft, nicht nur bei der Einarbeitung sondern während der gesamten Zeit im Labor. Ihre stetige Unterstützung war ein unerlässlicher Beitrag zur Fertigstellung dieser Arbeit.

11 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Amelia Beatrice Oei
Geburtsdatum:	10.10.1988
Geburtsort:	Hamburg
Nationalität:	Deutsch

Schulischer Werdegang

08/1995 – 07/1999	Grundschule Bovestraße, Hamburg
08/1999 – 06/2008	Charlotte-Paulsen-Gymnasium, Hamburg
07/2008	Abschluss des Gymnasiums mit Hochschulreife

Hochschulstudium

04/2009 – 03/2011	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität, Gießen
03/2011	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2011 – 11/2015	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
03/2013	Beginn des praktischen Teils der Dissertation
10/2014	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2014 – 10/2015	Praktisches Jahr
11/2015	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

11/2014 – 03/2015	Innere Medizin, Sana Klinik Lübeck
03/2015 – 06/2015	Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité Universitätsklinikum Berlin, Campus Benjamin Franklin
06/2015 – 10/2015	Chirurgie, Hue Central Hospital, Hue, Vietnam

12 Publikation

Recke A, Oei A, Hübner F, Fechner K, Graf J, Hagenah J, May C, Woitalla D, Salmen A, Zillikens D, Gold R, Schlumberger W, Schmidt E. Parkinson's disease and multiple sclerosis are not associated with autoantibodies against structural proteins of the dermal-epidermal junction. Br J Dermatol. 2016 Aug; 175(2): 407-9.

Präsentation der Ergebnisse in Form eines Posters bei der 43. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung in Wien im März 2016

Recke A, Oei A, Hübner F, Fechner K, Graf J, Hagenah J, May C, Woitalla D, Salmen A, Zillikens D, Gold R, Schlumberger W, Schmidt E. Parkinson’s disease and multiple sclerosis are not associated with a higher incidence of autoantibodies against structural proteins of the dermal-epidermal junction. 43. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, 10.-12.03.2016, Wien. Exp. Dermatol 2016; 128: S21-22.

13 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst wurde. Alle benutzten Quellen (wörtlich oder sinngemäß) sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht worden.

_____

Lübeck, den