

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka

**Immungenetische Untersuchungen zur Assoziation von  
Polymorphismen im nicht-klassischen MHC-Klasse-Ib-Gen *HLA-G*  
mit der schwangerschaftsinduzierten Autoimmundermatose  
Pemphigoid gestationis**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Ruth Ilana Goldscheider  
aus  
München  
2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. G. Messer
Mitberichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Udo Kummer Priv.-Doz. Dr. med. Bettina Toth
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. J. Glas
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	19.11.2009

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	3
1.1 Pemphigoid gestationis (Herpes gestationis) - eine schwangerschaftsinduzierte Autoimmunerkrankung	3
1.1.1 Allgemeines	3
1.1.2 Epidemiologie und Krankheitsbild des Pemphigoid gestationis	3
1.1.3 Diagnostik und Therapie des Pemphigoid gestationis	5
1.1.4 Fetales und neonatales Risiko	7
1.2 Zur Ätiologie des Pemphigoid gestationis	8
1.2.1 Das Zielantigen Kollagen Typ XVII / BP180	8
1.2.2 Schwangerschaft und Trophoblasttumore als Auslöser	10
1.2.3 Die Rolle genetischer Faktoren	13
1.3 HLA-G - ein nicht-klassisches HLA-Molekül	15
1.3.1 Allgemeines	15
1.3.2 Einteilung der HLA-Moleküle	16
1.3.3 Genorganisation und Struktur von HLA-G	16
1.3.4 Polymorphismen im HLA-G-Gen und HLA-G-Promotor	18
1.3.5 Gewebeverteilung und Funktion von HLA-G	21
<b>2. Zielsetzung</b>	26
<b>3. Material</b>	28
3.1 Studienkollektiv	28
3.1.1 Patientenkollektiv	28
3.1.2 Kontrollkollektiv	28
3.2 Kits und Chemikalien	28
3.2.1 Materialien für die DNA-Isolierung	28
3.2.2 Materialien für die Polymerasekettenreaktion	29
3.2.3 Materialien für den Restriktionsverdau	30
3.2.4 Materialien für die Agarosegelelektrophorese	31
3.3 Oligonukleotid-Primer	31
3.3.1 Primer zur Genotypisierung des 14-bp-Insertions- Deletions-Polymorphismus	32
3.3.2 Primer zur Genotypisierung der <i>HLA-G</i> -Promotorpolymorphismen	32

3.4 Geräte	33
<b>4. Methoden</b>	34
4.1 Allgemeine Vorgehensweise	34
4.2 Molekularbiologische Methoden	34
4.2.1 Isolierung genomischer DNA	34
4.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	35
4.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
4.2.4 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-(RFLP)-Analyse	39
4.2.5 Agarosegelelektrophorese	40
4.3 Statistische Auswertung	41
4.3.1 Der Exakte Test nach Fisher	42
<b>5. Ergebnisse</b>	43
5.1 Typisierung des 14-bp-Indel-Polymorphismus in Exon 8 von <i>HLA-G</i> (rs1704)	43
5.2 Typisierung ausgewählter Einzelnukleotidpolymorphismen im <i>HLA-G</i> -Promotor	47
5.2.1 Der Einzelnukleotidpolymorphismus -1306 (rs1736936)	49
5.2.2 Der Einzelnukleotidpolymorphismus -964 (rs1632947)	52
5.2.3 Der Einzelnukleotidpolymorphismus -762 (rs1632946)	54
5.2.4 Der Einzelnukleotidpolymorphismus -725 (rs1233334)	57
5.3 Familienstammbäume	60
<b>6. Diskussion</b>	64
<b>7. Zusammenfassung</b>	74
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	76
<b>9. Anhang</b>	89
9.1 Patientenkollektiv	89
9.2 Kontrollkollektiv	90

# 1. Einleitung

## 1.1 Pemphigoid gestationis (Herpes gestationis) - eine schwangerschaftsinduzierte Autoimmunerkrankung

### 1.1.1 Allgemeines

Eine erste Beschreibung des Krankheitsbildes erfolgte im Jahre 1811 durch Bunes (nach Zillikens 2005). Im Jahre 1872 wurde bereits der immer noch gebräuchliche Name Herpes gestationis von dem Englischen Dermatologen John Laws Milton geprägt. In jüngster Zeit wird in der wissenschaftlichen Literatur jedoch vorwiegend der von Holmes und Black (1982) vorgeschlagene Begriff Pemphigoid gestationis verwendet. Holmes und Black verwiesen auf die bisherige irreführende, rein deskriptive Namensgebung, die bei einem so seltenen Krankheitsbild leicht zur Verwechslung mit einer durch Herpesviren ausgelösten Erkrankung führen könne. Außerdem trage der Name Pemphigoid gestationis den neuesten Erkenntnissen über die Pathogenese der Erkrankung, die durch Autoantikörper gegen das Hauptzielantigen des bullösen Pemphigoid ausgelöst wird, Rechnung. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird deshalb die Verwendung des Begriffs Herpes gestationis vermieden und der neuere Krankheitsnamen Pemphigoid gestationis (PG) bevorzugt.

### 1.1.2 Epidemiologie und Krankheitsbild des Pemphigoid gestationis

Das Pemphigoid gestationis ist eine seltene Erkrankung. Seine Inzidenz wird in der Literatur mit 1:1700 bis 1:50 000 Schwangerschaften angegeben (Holmes et al. 1982, Roger et al. 1994). Dabei kommen Autoren jüngerer Studien, vermutlich aufgrund verbesserter Diagnosemöglichkeiten, auf höhere Fallzahlen (Shimanovich 2002). Obwohl in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle schwangere Frauen betroffen sind, wird vereinzelt auch über das Auftreten von Pemphigoid gestationis im Zusammenhang mit Trophoblasttumoren berichtet (Tillman 1950, Dupont 1974, Tindall et al. 1981, do Valle Chiossi et al. 2000, Djahansouzi et al. 2003).

Die ersten Krankheitssymptome treten bei den betroffenen Frauen zumeist im zweiten oder dritten Schwangerschaftsdrittel auf. In der bislang größten klinischen Studie mit 87

Patientinnen waren die ersten Symptome in 34% der Fälle im zweiten, und bei weiteren 34% der Patientinnen im dritten Schwangerschaftstrimenon zu beobachten. Aber auch frühere Erkrankungszeitpunkte (bei 18% im ersten Trimenon) und ein erstes Auftreten des Pemphigoid gestationis in der frühen Postpartalperiode (14%) sind nicht selten (Jenkins et al. 1999). Unbehandelte Verläufe zeigen in vielen Fällen eine Tendenz zur Besserung in den letzten Wochen vor der Geburt, um dann postpartal noch einmal zu exazerbieren (Jenkins et al. 1993).

In der Regel ist der Krankheitsverlauf selbst limitierend und die Patientinnen sind sechs Monate nach der Entbindung wieder erscheinungsfrei (Jenkins et al. 1999).

Gelegentlich wird in der Literatur allerdings über längere Krankheitsverläufe mit einer Erkrankungsdauer von bis zu mehreren Jahren berichtet (Jenkins et al. 1995, Boulinguez et al. 2003). Das Pemphigoid gestationis tritt keineswegs immer schon in der ersten Schwangerschaft auf. Jenkins und Shornick (2002) berichten, dass bei zwei Dritteln der Multipara Krankheitssymptome in der Erstschwangerschaft fehlten. War eine Frau jedoch einmal an Pemphigoid gestationis erkrankt, so ist ein Rezidiv in einer Folgeschwangerschaft zwar nicht zwingend (rezidivfreie sog. „skip pregnancies“ treten in 8% der Folgeschwangerschaften auf) aber dennoch sehr wahrscheinlich. Auch der Verlauf ist dann meist schwerer und die Krankheitssymptome setzen früher ein. Gleichwohl besteht von ärztlicher Seite keine Kontraindikation für eine erneute Schwangerschaft, da die Therapiemöglichkeiten heute sehr gut, und die Risiken für Mutter und Kind überschaubar sind.

Die Erkrankung ist anfangs durch eine nicht bullöse Prodromalphase gekennzeichnet, während der Pruritus und papulovesikulöse bzw. urtikarielle Plaques im Vordergrund stehen. In diesem Stadium ist differenzialdiagnostisch die Abgrenzung zu der relativ häufigen polymorphen Schwangerschaftsdermatose (polymorphic eruption of pregnancy, PEP) und zum atopischen Ekzem nicht einfach. Nach einigen Tagen bis Wochen treten dann im blasenbildenden Stadium auf normaler oder erythematöser Haut intakte, pralle Blasen auf. Diese haben meist einen klaren Inhalt und heilen nach einigen Tagen als krustöse Erosionen ab. Bei 90% der Frauen beginnen die Hautveränderungen periumbilikal um sich anschließend auf Stamm und Extremitäten auszubreiten. Selten erfolgt auch eine Ausbreitung auf die okulären oder genitalen Schleimhäute (Jenkins et al. 1999). Dass die ersten Effloreszenzen, im Gegensatz zum bullösen Pemphigoid, beim Pemphigoid gestationis ausgerechnet periumbilikal auftreten, wird der

schwangerschaftsbedingten, starken, mechanischen Belastung der Haut am Abdomen zugeschrieben.

### **1.1.3 Diagnostik und Therapie des Pemphigoid gestationis**

Besteht klinisch der Verdacht auf Pemphigoid gestationis, so werden die histologische Beurteilung einer Hautbiopsie, die Methoden der direkten sowie der indirekten Immunfluoreszenzuntersuchung, die serologische Bestimmung von Pemphigoid-gestationis-Antikörpern und der ELISA zur Bestätigung der Diagnose herangezogen (Messer und Meurer 2001, Hertl 2009).

Im histologischen Präparat stellt sich charakteristischerweise ein subepidermaler Spalt mit einem Infiltrat von eosinophilen Granulozyten im Bereich der dermoepidermalen Junctionszone dar. Mittels der direkten Immunfluoreszenzuntersuchung lassen sich fast immer charakteristische Niederschläge von C3 und in 25% der Fälle auch von IgG entlang der Basalmembranzzone (BMZ) darstellen (Shornick 1987).

Beim Einsatz einer Sonderform der indirekten Immunfluoreszenzuntersuchung, bei der zusätzlich mit einer Komplementquelle inkubiert wird, lassen sich bei den meisten der betroffenen Frauen im Blut zirkulierende Autoantikörper vom IgG1-Typ am epidermalen Anteil der Spalthaut (Blasendach) nachweisen (Katz et al. 1976). Dies gelingt beim Einsatz der konventionellen Technik ohne Komplementfaktoren nur in ca. 30% der Fälle (Jenkins und Shornick 2002).

Immunserologische Nachweisverfahren (ELISA und Immunoblot) mit rekombinantem Kollagen-Typ-XVII-Autoantigen (BP180 Domäne NC16a) sind von hoher Sensitivität und Spezifität und mittlerweile Standard bei der Differenzialdiagnostik in unklaren Fällen (Sato et al. 1999, Messer und Meurer 2001, Powell et al. 2005a).

Differenzialdiagnostische Erwägungen bei Verdacht auf Pemphigoid gestationis beziehen in der Regel andere blasenbildende Autoimmundermatosen, infektiös, allergisch oder toxisch bedingte blasenbildende Dermatosen und insbesondere die relativ häufig vorkommende polymorphe Schwangerschaftsdermatose (Inzidenz ca. 1: 160 Schwangerschaften) mit ein (Borradori 1994, Ambros-Rudolph et al. 2006).

Ziel der Therapie ist die Linderung des oft quälenden Juckreizes sowie das Verhindern der Entstehung neuer Blasen. Der alleinige Einsatz von topischen Steroiden, eventuell in Kombination mit Antihistaminika, ist nur im Frühstadium oder bei sehr milden Verlaufsformen gerechtfertigt und in der Regel nicht ausreichend (Jenkins et al. 1999).

Ist das blasenbildende Stadium einmal erreicht, so ist der Einsatz systemischer Glukokortikoide unvermeidbar. Initial wird meist mit Dosen von 0,25-0,50 mg/kg Körpergewicht Prednisolonäquivalent pro Tag begonnen. Bei gutem Ansprechen auf die Therapie kann eine schnelle Reduktion der Dosis bis zum Ende der Schwangerschaft erreicht werden. Bei den meisten Verläufen kommt es postpartal zu einem erneuten Krankheitsschub. Eine Erklärung hierfür könnte das Absinken des in der Spätschwangerschaft und unter der Geburt physiologisch erhöhten, endogenen Kortisolspiegels sein (Pfeiffer 2001). Um ein postpartales Krankheitsrezidiv zu vermeiden, sollte die Glukokortikoiddosis nach der Entbindung noch einmal gesteigert werden bevor eine endgültige Dosisreduktion über mehrere Wochen erfolgt. Nach Wiedereinsetzen der Menses kommt es oft erneut zu Pruritus und urtikariellen Erythemen.

Die Wirkung der systemischen Glukokortikoidtherapie auf den Fetus ist gut dokumentiert, da diese als Mittel der ersten Wahl bei akuten Schüben rheumatischer Erkrankungen in der Schwangerschaft schon lange zum Einsatz kommt (Ramsey-Goldman und Schilling 1996). Eine teratogene Wirkung auf den Embryo konnte in retrospektiven Studien nicht festgestellt werden (Fraser und Sajoo 1995). Bei längerfristiger Einnahme von Dosen über 10 mg Prednisolonäquivalent pro Tag besteht allerdings ein etwas erhöhtes Risiko für intrauterine Wachstumsretardierung, Plazentarinsuffizienz und neonatale Immunsuppression und bei Dosen von über 20 mg pro Tag auch für Frühgeburtlichkeit (Pfeiffer 2001).

Da es beim Neugeborenen zu einer passageren Nebennierenrindeninsuffizienz kommen kann, sollten nach der Geburt eine Kontrolle der kindlichen Nebennierenfunktion und gegebenenfalls eine Glukokortikoidsubstitution durch den Neonatologen erfolgen. Bei der Mutter können alle bekannten, durch Glukokortikosteroide auslösbaren Nebenwirkungen beobachtet werden. Besonderes Augenmerk sollte aber auf das Risiko der Induktion eines Diabetes mellitus und/oder eines arteriellen Hypertonus gelegt werden, da diese den Verlauf der Schwangerschaft erheblich komplizieren können. Stillen während der Einnahme von Prednison und Prednisolon ist laut einer Empfehlung der American Academy of Pediatrics (1994) grundsätzlich möglich, obwohl diese in die Muttermilch übergehen. Um eine geringst mögliche Reduktion der Steroidbelastung des Säuglings zu erzielen, sollte der Abstand zwischen Medikamenteneinnahme und Stillen möglichst vier Stunden betragen (Ostensen und Husby 1985).



Bemerkenswerterweise führt die postpartale Einnahme oraler Kontrazeptiva bei etwa jeder zweiten Patientin zu einem neuerlichen Krankheitsschub und die Betroffenen sollten darauf hingewiesen werden, die Einnahme zu vermeiden (Shornick et al. 1983b). Eine therapeutische Herausforderung stellen die selten zu beobachtenden, langwierigen und/oder auf die Therapie mit Glukokortikoiden schlecht ansprechenden Verläufe von Pemphigoid gestationis dar. Therapieversuche mit Immunsuppressiva wie Cyclophosphamid, Dapson, Cyclosporin, Azathioprin und Methotrexat sind mit nur teilweise guten Erfolgen durchgeführt worden (Engineer et al. 2000, Boulinguez et al. 2003, Hanneken et al. 2005). Daneben gibt es Berichte über den erfolgreichen Einsatz von hochdosierten intravenösen Immunglobulinen (IVIG) und Immunapherese (Wöhrl et al. 2003, Kreuter et al. 2004). In jüngerer Zeit wurde über den erfolgreichen therapeutischen Einsatz von Rituximab bei einem Fall von chronischem Pemphigoid gestationis berichtet, bei welchem eine Langzeitremission erzielt werden konnte (Cianchini 2007).

#### **1.1.4 Fetales und neonatales Risiko**

Bei ca. 5% der Neugeborenen, deren Mütter während der Schwangerschaft an Pemphigoid gestationis erkrankten, sind in den ersten Tagen und Wochen nach der Geburt ähnliche Hautveränderungen zu beobachten (Jenkins et al. 1993). Dieses Phänomen erklärt sich durch die Zugehörigkeit der Pemphigoid-gestationis-Antikörper zur Subklasse G der Immunglobuline. Diese Antikörperklasse kann die Plazentaschranke passieren und an der Basalmembranzzone der Neugeborenenhaut die Spaltbildung provozieren. Eine Ablagerung von Antikörpern an der Neugeborenenhaut lässt sich durch direkte Immunfluoreszenzuntersuchung auch bei erscheinungsfreier Haut nachweisen, so dass ein subklinischer Verlauf bei allen Kindern angenommen wird (Jenkins und Shornick 2002). Der Abbau der im kindlichen Blut zirkulierenden Antikörper, und somit auch das Abklingen der Hautveränderungen, erfolgt innerhalb weniger Wochen post partum. Protrahierte Krankheitsverläufe bei Neugeborenen werden nicht beobachtet.



Abbildung 1: Pemphigoid gestationis neonatalis. Am gesamten Integument finden sich in symmetrischer und disseminierter Anordnung erythematöse, urtikarielle Plaques sowie multiple zum größten Teil erodierte Blasen.

Bezüglich der Einschätzung des fetalen Risikos gibt es in der Literatur teils widersprüchliche Daten (Lawley et al. 1978, Shornick und Black 1992a). Die Fehl- und Totgeburtenrate bei Müttern, die an Pemphigoid gestationis erkranken liegt nicht über der Norm. Allerdings konnten eine höhere Frühgeburtenrate und ein vermindertes Geburtsgewicht der Neugeborenen (small for gestational age, d. h. das Geburtsgewicht liegt unterhalb der 10%-Perzentile des Normgewichts für das entsprechende Schwangerschaftsalter) festgestellt werden (Shornick und Black 1992a). Dies spricht im Allgemeinen für eine Funktionsstörung der Plazenta im Sinne einer leichten Plazentarinsuffizienz. Durch eine Erkrankung der Mutter an Pemphigoid gestationis verkomplizierte Schwangerschaften sollten deshalb wegen der oben genannten möglichen Komplikationen als Risikoschwangerschaften eingestuft werden (Engineer et al. 2000).

## 1.2 Zur Ätiologie des Pemphigoid gestationis

### 1.2.1 Das Zielantigen Kollagen Typ XVII / BP180

Als Autoantigen des Pemphigoid gestationis konnte Kollagen Typ XVII, ein Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 180 kDa, identifiziert werden (Morrison et al. 1988). Synonyme für Kollagen Typ XVII sind bullöses Pemphigoidantigen 180 (BP180) und BPAg2.

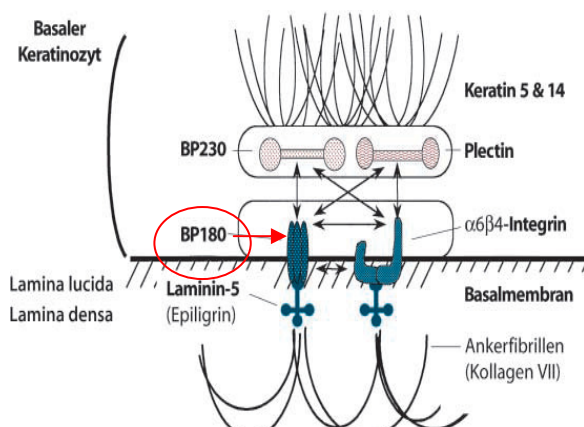


Abbildung 2: Basalmembranzzone. Dargestellt ist ein Hemidesmosom mit verschiedenen Autoantigenen für blasenbildende Autoimmunerkrankungen. Das bullöse Pemphigoidantigen Kollagen Typ XVII (BP180) ist rot umkreist. (Angelehnt an Hertl und Schuler 2002)

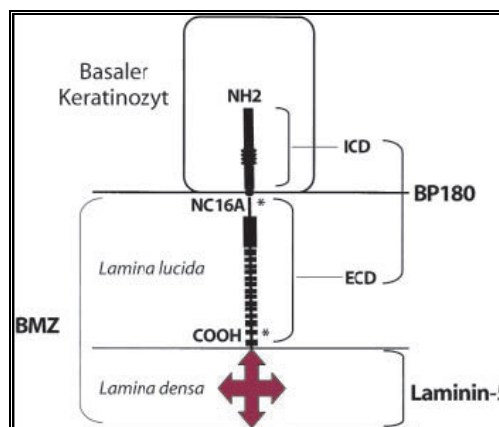


Abbildung 3: Autoantikörperepitope von BP 180. Die 16. nicht kollagene Domäne (NC16A) wird von den meisten Pemphigoid-gestationis-Seren erkannt. ICD= intrazelluläre Domäne, ECD= extrazelluläre Domäne, BMZ= Basalmembranzzone. (Angelehnt an Hertl und Schuler 2002)

Als transmembranöses Adhäsionsmolekül kommt Kollagen Typ XVII eine wichtige Rolle als Strukturelement der Hemidesmosomen in der dermoepidermalen Junctionszone zu. Insbesondere der Zusammenhalt intra- und extrazellulärer, hemidesmosomaler Proteine scheint durch Kollagen Typ XVII gewährleistet zu werden (Powell et al. 2005b). Da es sich um ein Transmembranprotein mit Typ-II-Orientierung handelt, besitzt Kollagen Typ XVII einen zytosolischen NH<sub>2</sub>-Terminus und einen extrazellulären Carboxy(COOH)-Terminus. Der 1008 Aminosäuren umfassende, extrazelluläre Anteil setzt sich im Wechsel aus 15 kollagenen und 16 nicht kollagenen Bereichen zusammen (Franzke et al. 2003). Besondere Bedeutung als antigene Determinante kommt dabei der unmittelbar an der Zellmembran der basalen Keratinozyten liegenden sechzehnten nicht kollagenen Domäne (NC16A) zu: Pemphigoid-gestationis-Seren reagieren vor allem mit diesem Anteil des Kollagen-Typ-XVII-Moleküls (Giudice et al. 1993). Es konnte gezeigt werden, dass aus Pemphigoid-gestationis-Seren gewonnene Autoantikörper an zwei bestimmte Epitope, die Aminosäuresequenzen aa 500-514 und aa 511-523, innerhalb der NC16A-Domäne binden (Lin et al. 1999, Chimanovitch et al. 1999, Herrero-Gonzalez et al. 2006). Kollagen Typ XVII dient als Zielantigen mehrerer Autoimmunerkrankungen, bei denen es jeweils zu subepidermaler Blasenbildung kommt. Dies sind neben dem Pemphigoid gestationis das bullöse Pemphigoid, das vernarbende Schleimhautpemphigoid und die lineare IgA-Dermatose (Zillikens 1999). Analog führen Mutationen im für Kollagen

Typ XVII kodierendes Gen *COL17A* ebenfalls zu einer Erkrankung mit subepidermaler Blasenbildung, welche zur Gruppe der Epidermolysis bullosa junctionalis gezählt wird (Powell et al. 2005b).

Für die pathogenetische Relevanz von Autoantikörpern gegen das Kollagen-Typ-XVII-Molekül sprechen Tiermodelle, bei denen der Transfer von Kaninchenantikörpern gegen Kollagen Typ XVII in neugeborenen Mäusen und Hamstern eine subepidermale Spaltbildung provozierte (Liu et al. 1993, Yamamoto et al. 2002). Das Kollagen-Typ-XVII-Molekül findet sich außer an der dermoepidermalen Junktionszone auch in der Basalmembranzzone von Amnion- und Chorionepithel der Plazenta (Ortonne et al. 1987, Kelly et al. 1988). Amnionepithelzellen und verschiedene Subpopulationen von Trophoblastzellen exprimieren das Molekül bereits zu Beginn der Schwangerschaft (Huilaja et al. 2008).

### **1.2.2 Schwangerschaft und Trophoblasttumore als Auslöser**

Das Pemphigoid gestationis nimmt unter den Autoimmunerkrankungen eine sehr besondere Stellung ein. Als einzige Autoimmunerkrankung wird es durch eine Schwangerschaft, oder selten durch einen schwangerschaftsassozierten Tumor, ausgelöst und klingt nach der Entbindung in der überwiegenden Zahl der Fälle innerhalb von sechs Monaten wieder ab (Jenkins et al. 1999). Obwohl aufgrund klinischer und pathogenetischer Merkmale eine sehr enge Verwandtschaft zum bullösen Pemphigoid besteht, ist das Pemphigoid gestationis durch seine ausschließliche Assoziation mit Schwangerschaft und Trophoblasttumoren einzigartig.

Da der Auslöser des Pemphigoid gestationis von einigen Autoren in der Plazenta vermutet wird, eine sehr hohe Assoziation zu bestimmten Transplantationsantigenen besteht, und die Plazenta als Hauptexpressionsort des HLA-G-Moleküls beschrieben ist, wird im Folgenden der relativ komplexe Aufbau der humanen Plazenta kurz zusammengefasst (Le Bouteiller und Mallet 1997, Sadler 1998, Engineer et al. 2000, Shimanovich et al. 2002). Dabei wird vor allem auf Strukturen, die für das Verständnis der vorliegenden Arbeit wichtig sind, eingegangen.

Aus der befruchteten Eizelle entwickeln sich schon am fünften Tag nach der Befruchtung Embryoblast und Trophoblast. Während sich aus dem Embryoblast der eigentliche Embryo entwickelt, gehen aus dem Trophoblast die fetalen Anteile der Eihäute und der Plazenta hervor. Die innerste den Fetus, die Nabelschnur und die

Fruchthöhle umgebende Schicht der Eihäute ist das Amnion. Vom einschichtigen Amnionepithel wird auch das Fruchtwasser (amniotic fluid) abgesondert. Die Trophoblastzellen kommen in der zweiten Woche nach der Befruchtung an der Uterusschleimhaut zu liegen und beginnen dort ihr invasives Wachstum. Sie differenzieren sich dabei zunächst in die villösen und die extravillösen Trophoblasten. Die villösen Trophoblasten differenzieren sich anschließend in die Zytotrophoblasten und die Synzytiotrophoblasten. In der dritten Woche findet man bereits eine große Anzahl von Primärzotten, die aus einem Zytotrophoblastkern bestehen und von einer Synzytiotrophoblastschicht überzogen sind. Hieraus wird später der Zottenbaum (Villus), der Ort des Stoffaustausches zwischen mütterlichem und fetalem Blut. Obwohl die fetalen Blutgefäße im Inneren der Zotten liegen, und die Zotten von mütterlichem Blut umspült werden, verhindert die Plazentaschranke jeden direkten Kontakt von mütterlichem und kindlichem Blut. Sie besteht aus dem Endothel der fetalen Kapillaren, Bindegewebe, einer Zytotrophoblastzellschicht sowie einer durchgehenden, äußeren Zellschicht aus Synzytiotrophoblasten. Antikörper vom IgG-Typ werden allerdings mit Hilfe des neonatalen Fc-Rezeptors für IgG (FcRn) durch die Plazentaschranke transportiert und können so unter Umständen zum Pemphigoid gestationis neonatalis führen.

Den villösen Synzytiotrophoblasten kommt im weiteren Verlauf der Schwangerschaft vor allem die Aufgabe der Hormonsynthese und des Stoffaustausches mit dem mütterlichen Blut zu. Die extravillösen Trophoblasten sind hingegen für die Zellmigration und Invasion in Dezidua und Spiralarterien sowie für die Ausbildung der Chorionmembran verantwortlich. Extravillöse Trophoblasten bilden ab der dritten Woche nach der Befruchtung die Schicht unmittelbar an der Grenzzone zur Dezidua aus. An dieser fetomaternalen Grenzzone (fetomaternal interface) stehen mütterliches und kindliches Gewebe in direktem Kontakt (Kovats et al. 1990).

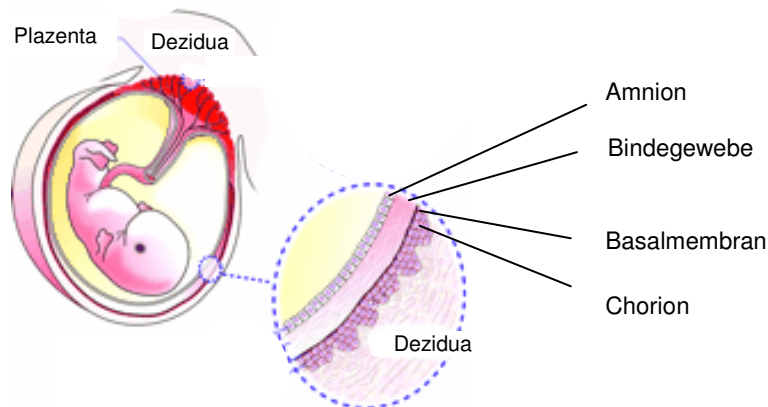


Abbildung 4: Fetus und Plazenta mit Eihäuten. Der Fetus ist umgeben von den Eihäuten. Das einschichtige Amnionepithel sondert das Fruchtwasser (gelb) ab und bildet eine straffe, schützende Hülle. Chorionmembran und Plazenta (rot) werden von Trophoblastzellen gebildet. Die Chorionmembran wird von extravillösen Trophoblasten gebildet. Sie steht im unmittelbaren Kontakt zum mütterlichen Gewebe der Dezidua und bildet mit dieser die fetomaternalen Grenzzone. (Angelehnt an Hunt et al. 2005)

Das Zielantigen des Pemphigoid gestationis, Kollagen Typ XVII, findet sich, wie bereits erwähnt, auch in der Basalmembranzzone von Amnionepithel und Chorion (Ortonne et al. 1987, Kelly et al. 1988). In einer neueren Studie konnten Huilaja et al. (2008) nachweisen, dass Kollagen Typ XVII bereits im ersten Schwangerschafts-trimenon in den villösen Zytotrophoblasten und den Synzytiotrophoblasten des Zottenepithels sowie in den extravillösen Trophoblasten an der fetomaternalen Grenzzone exprimiert wird. Im Vergleich zwischen Plazenten von Pemphigoid-gestationis-Patientinnen und Kontrollindividuen war dabei kein Unterschied im Verteilungsmuster oder der mRNA-Menge von Kollagen Typ XVII auszumachen. Allerdings wiesen die Pemphigoid-gestationis-Plazenten in der histologischen Untersuchung Entzündungsanzeichen im Sinne einer leichten Villitis auf (Huilaja et al. 2008). Dies entspräche dem morphologischen Korrelat der bereits von Shornick und Black (1992a) vermuteten, leichten Plazentarinsuffizienz bei Pemphigoid gestationis. In sehr seltenen Fällen wurde über ein Auftreten des Pemphigoid gestationis im Zusammenhang mit schwangerschaftsassozierten Trophoblasttumoren berichtet (Tillman 1950, Dupont 1974, Tindall et al. 1981, do Valle Chiossi et al. 2000, Djahansouzi et al. 2003). Dabei führt eine gesteigerte Proliferation der Trophoblasten zu einer tumorösen Entartung plazentaren Gewebes. Man unterscheidet eine gutartige, auf den Uterus beschränkte, nicht invasive Form (Blasenmole, Mola hydatidosa) und eine

bösartige, metastasierende Form (Chorionkarzinom). Komplette Blasenmolen entstehen, wenn es zu einer aberranten Befruchtung einer leeren Eizelle durch ein, oder seltener, zwei Spermien kommt. Das genetische Material der kompletten Blasenmole stammt dabei ausschließlich vom Vater. Bei den partiellen Blasenmolen wird eine intakte Eizelle von zwei Spermien befruchtet. Das genetische Material stammt dann von Mutter und Vater. Chorionkarzinome gehen entweder aus einer Blasenmole (dann fast immer aus einer kompletten Blasenmole), einem Abort oder einer normalen Schwangerschaft hervor (Garner et al. 2007). Das Chorionkarzinom kann auch beim Mann entstehen. Über ein Auftreten des Pemphigoid gestationis bei an Chorionkarzinomen erkrankten Männern gibt es in der Literatur keine Berichte, obwohl diese Erkrankung auch beim Mann biologische Vorgänge ähnlich einer Schwangerschaft bewirkt. Einige Autoren sehen dadurch die Rolle von plazentarem Gewebe als Auslöser des Krankheitsprozesses gestärkt (Jenkins und Shornick 2002, Shimanovich et al. 2002). Zusammenfassend bleibt zu den Unterschieden zwischen männlichem und weiblichem Chorionkarzinom zu sagen, dass bei der Frau genetisch teilweise fremdes Gewebe tumorös entartet, während beim Mann das Tumorgewebe genetisch homolog ist. Das Fehlen von genetisch fremdem Gewebe könnte somit die Auslösung der Autoimmunreaktion verhindern.

Neben der Konfrontation des mütterlichen Organismus mit dem semiallogenen, fetalen Gewebe, und den damit verbundenen Veränderungen auf immunologischer Ebene ist auch ein Einfluss hormoneller Steuerungsmechanismen auf die Pathogenese des Pemphigoid gestationis anzunehmen (Holmes et al. 1983, Messer et al. 1993, Engineer et al. 2000). Insbesondere die häufige Beobachtung einer Symptomverstärkung bzw. eines Rezidivs beim Einsetzen der ersten postpartalen Menstruationsblutungen und nach Anwendung oraler Kontrazeptiva sprechen für diese wichtige Rolle hormoneller Faktoren. So könnte die schnellere postpartale Erscheinungsfreiheit bei stillenden Müttern z.B. auf den durch das Stillen erhöhten Prolaktinspiegel zurückzuführen sein (Holmes et al. 1983, Engineer 2000).

### **1.2.3 Die Rolle genetischer Faktoren**

Seit etwa fünfundzwanzig Jahren ist eine Assoziation zwischen dem Pemphigoid gestationis und dem Vorkommen bestimmter Allele der Transplantationsantigene der HLA-DR-Untergruppe bekannt: 60-80% der Patientinnen besitzen DR3, etwa 50% DR4

und etwa 45% sowohl DR3 als auch DR4. Im Gegensatz dazu besitzen nur etwa 3% der Normalbevölkerung den kombinierten HLA-DR3/DR4 Genotyp (Shornick et al. 1981). Dies erklärt auch das wesentlich höhere Erkrankungsrisiko für Angehörige der kaukasischen Rasse, denn Kaukasier weisen eine bedeutend höhere Allelfrequenz der Transplantationsantigene HLA-DR3, HLA-DR4 oder einer Kombination beider Typen auf (Shornick et al. 1984). In einer Studie über das Auftreten von Pemphigoid gestationis in Mexiko besaßen z. B. alle acht betroffenen Frauen den kombinierten DR3/DR4 Genotyp, der bei Mexikanern nicht-europäischer Herkunft nur sehr selten vorkommt (Garcia-Gonzalez et al. 1999).

Interessanterweise ist auch der HLA-Typ des Vaters für die Erkrankungswahrscheinlichkeit der Mutter von Bedeutung. Besitzt dieser den HLA-Typ DR2 so steigt das Risiko der Mutter an Pemphigoid gestationis zu erkranken signifikant an (Shornick et al. 1983a). Dies legt nahe, dass väterliche Antigene im Sinne einer immunologisch mediierten Krankheitsentstehung beteiligt sein könnten. Allerdings konnte in der bislang größten klinischen Studie mit 87 Patientinnen kein verändertes statistisches Risiko für eine Erkrankung an Pemphigoid gestationis festgestellt werden, wenn es nach einem Partnerwechsel zu einer erneuten Schwangerschaft der Betroffenen kam (Jenkins et al. 1999). Obwohl die Expression der HLA-Antigene vom Typ DR3 und/oder DR4 bei der Mutter und vom Typ HLA-DR2 beim Vater die wichtigsten bekannten genetischen Risikofaktoren für die Erkrankungswahrscheinlichkeit am Pemphigoid gestationis darstellen, haben sie dennoch keinen erkennbaren Einfluss auf Dauer oder Schwere der Erkrankung (Jenkins und Shornick 2002).

Ferner wurde beim Pemphigoid gestationis eine Assoziation mit bestimmten Allelen des MHC-Klasse-III-Komplexes festgestellt. In einer 48 Patientinnen umfassenden Studie trugen 90% das Nullallel für C4 (Shornick et al. 1993). Dies könnte allerdings auf der Tatsache beruhen, dass die Genloci für MHC-Klasse-II- und MHC-Klasse-III-Gene in enger Nachbarschaft auf Chromosom 6 liegen. Da ein starkes Kopplungsungleichgewicht zwischen HLA-DR3 und dem Nullallel für C4 bei Westeuropäern häufig ist, könnte deshalb auch das Fehlen bestimmter Gene, die für Komponenten des Komplementsystems kodieren, das erhöhte Erkrankungsrisiko ausmachen (Engineer et al. 2000). Eine Assoziation sowohl mit HLA-DR3 als auch mit dem Nullallel für C4 besteht auch beim systemischen Lupus erythematodes (Hartung et al. 1992, Fernando et al. 2007). Ob diese Allele ursächlich an der Krankheitsentstehung beteiligt sind, oder lediglich in einem Kopplungsungleichgewicht mit



anderen pathogenetisch relevanten Allelen stehen, konnte bislang nicht geklärt werden (Fernanado et al. 2008).

Mit Pemphigoid gestationis assoziierte Autoimmunerkrankungen waren in der bislang größten klinischen Studie zum Thema bei 13,8% der betroffenen Frauen festzustellen (Jenkins et al. 1999). Dabei war insbesondere die signifikante Häufung von Erkrankungen am Morbus Basedow (10,3%) auffällig. Die Prävalenz des Morbus Basedow in der weiblichen Normalbevölkerung beträgt dabei lediglich 0,4% (Shornick und Black 1992). Da Morbus Basedow, Pemphigoid gestationis und Perniziöse Anämie überzufällig häufig mit den HLA-Typen DR3 und DR4 assoziiert sind, erklärt dies auch warum diese Autoimmunerkrankungen nicht selten nebeneinander bestehen (Farid 1987, Kaye 1987). Andere Autoimmunerkrankungen, über deren Auftreten im Zusammenhang mit Pemphigoid gestationis berichtet wurde, sind Alopecia areata, Vitiligo, Hashimoto-Thyreoiditis und Autoimmunthrombozytopenie.

### **1.3 HLA-G - ein nicht-klassisches HLA-Molekül**

#### **1.3.1 Allgemeines**

Die zelluläre Immunantwort stellt den wichtigsten Abwehrmechanismus des Immunsystems bei der Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen und entarteten Zellen dar. Zugrunde liegend für die Unterscheidung zwischen Selbst und Nicht-Selbst ist dabei die abschnittsweise Präsentation intrazellulär synthetisierter und anschließend prozessierter Proteine auf der Zelloberfläche. Die Antigenpräsentation erfolgt bei allen kernhaltigen Körperzellen durch die MHC-Moleküle. Diese membranständigen Glykoproteine gehören der Immunglobulinsuperfamilie an. Synonym spricht man beim Menschen von HLA-Molekülen oder, aufgrund ihrer wichtigen Rolle bei der Abstoßungsreaktion nach Organtransplantationen, von Transplantationsantigenen. CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) oder natürliche Killerzellen können dank der Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle gezielt Körperzellen erkennen, die fremdkodierte Peptide oder eine ungenügende Anzahl von Selbst-Peptiden (missing self) präsentieren.

Während die Aufgabe der klassischen HLA-Klasse-I-Moleküle vor allem in der Antigenpräsentation gegenüber den Zellen des Immunsystems zu sehen ist, nehmen die nicht-klassischen HLA-Klasse-I-Moleküle auch andere, z. T. noch unbekannte

Funktionen wahr. Insbesondere steht dabei das HLA-G-Molekül aufgrund seiner immunmodulatorischen Funktion und seiner postulierten Beteiligung an zahlreichen pathologischen Prozessen im Mittelpunkt des Interesses.

### 1.3.2 Einteilung der HLA-Moleküle

Die HLA-Moleküle werden von den Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) kodiert. Dieser liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (6p21.3) und erstreckt sich über ca. 4000 kb. Lediglich die  $\beta$ 2-Mikroglobulinuntereinheit wird auf Chromosom 15 (15q21) kodiert. Gene der Klasse-I-Region innerhalb des MHC kodieren für die  $\alpha$ -Ketten der HLA-Klasse-I-Moleküle. Zu den klassischen oder Klasse-Ia-Molekülen werden die hochpolymorphen Transplantationsantigene HLA-A, HLA-B und HLA-C zusammengefasst. Als nicht-klassische oder Klasse-Ib-Moleküle bezeichnet man hingegen die nur wenig polymorphen Transplantationsantigene HLA-E, HLA-F und HLA-G. Gene der HLA-Klasse-II-Region kodieren für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten der HLA-Klasse-II-Moleküle. Zu diesen zählt man HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ.

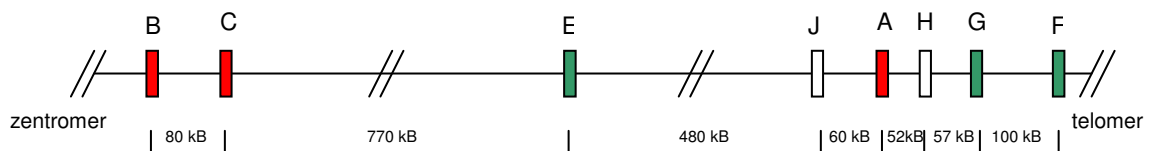


Abbildung 5: HLA-Klasse-I-Gene auf Chromosom 6 (6p 21-23). Klassische HLA-Klasse-I-Gene (rot), nicht-klassische HLA-Klasse-I-Gene (grün) und HLA-Pseudogene (weiß). Die Abstände zwischen den Genen sind jeweils in Kilobasen darunter angegeben. (Angelehnt an Messer et al. 1993 und Tan et al. 2005)

### 1.3.3 Genorganisation und Struktur von HLA-G

Die Genorganisation von *HLA-G* ähnelt in ihrer Exon-Intron-Struktur den klassischen HLA-Klasse-I-Genen. Auf die Promotorregion folgen im Wechsel acht Exons und sieben Introns (siehe Abbildung 6). Exon 1 beinhaltet einen kurzen 5'-untranslatierten Bereich (5'-untranslated region, 5'UTR) und ein Signalpeptid. Exon 2 kodiert die  $\alpha$ 1 Domäne, Exon 3 die  $\alpha$ 2 Domäne, Exon 4 die  $\alpha$ 3 Domäne und Exon 5 die Transmembranregion des HLA-G-Moleküls. Der zytoplasmatische Anteil der HLA-G-Moleküle wird von den Exons 6 und 7 kodiert. Exon 8 enthält schließlich noch den 3'-untranslatierten Bereich (3'-untranslated region, 3'UTR). Das *HLA-G*-Gen zeigt in

diesem Bereich einige Besonderheiten im Vergleich zu den klassischen HLA-Genen. Exon 6 enthält ein Stoppcodon, welches in einem verkürzten, zytoplasmatischen Anteil des Transmembranproteins resultiert und Exon 7 ist, abweichend von den klassischen HLA-Klasse-I-Genen, nicht in der reifen mRNA enthalten.

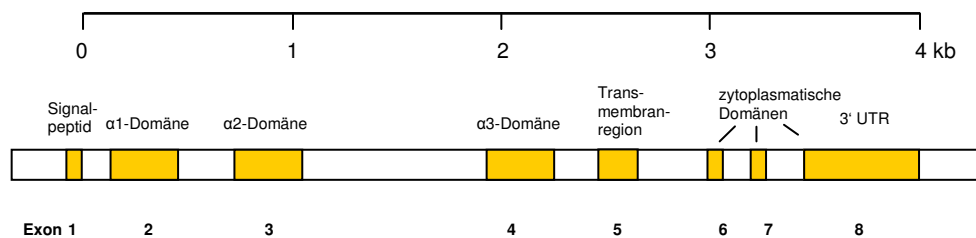


Abbildung 6: Genstruktur von *HLA-G*. Die Exons 1 bis 8 sind gelb dargestellt. Darüber ist jeweils angegeben, für welche Proteinstrukturen die verschiedenen Exons kodieren. Die Abstände in Kilobasen sind maßstabsgetreu angegeben. (Angelehnt an Hviid, 2006)

Eine weitere Besonderheit von *HLA-G* ist das Vorkommen verschiedener mRNA-Spleißvarianten, die zur Entstehung von verschiedenen Proteinstrukturen führen (Ishitani und Geraghty 1992). Bislang konnten sieben verschiedene Isoformen identifiziert werden (siehe Abbildung 7). Das *HLA-G1*-Transkript kodiert ein Transmembranmolekül, welches aus den Domänen  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  besteht und in Assoziation mit dem  $\beta 2$  Mikroglobulin auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Es weist von allen Isoformen die größte Homologie zu den klassischen HLA-Klasse-I-Molekülen auf und ist zur Peptidpräsentation fähig. Weitere membrangebundene Isoformen sind *HLA-G2* (mit fehlender  $\alpha 2$  Domäne), *HLA-G3* (mit fehlenden  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  Domänen) und *HLA-G4* (mit fehlender  $\alpha 3$  Domäne). Die Isoformen *HLA-G5*, -*G6* und -*G7* stellen jeweils lösliche Varianten der Isoformen *HLA-G1*, -*G2* und -*G3* dar. Bisher konnte für die Isoformen *HLA-G1* und *HLA-G2* der Nachweis der Zelloberflächenexpression auf Trophoblasten erbracht werden (Morales et al. 2003). Die lösliche Isoform *HLA-G5* wurde auch im Blut gesunder Probanden nachgewiesen (Rebmann et al. 1999).

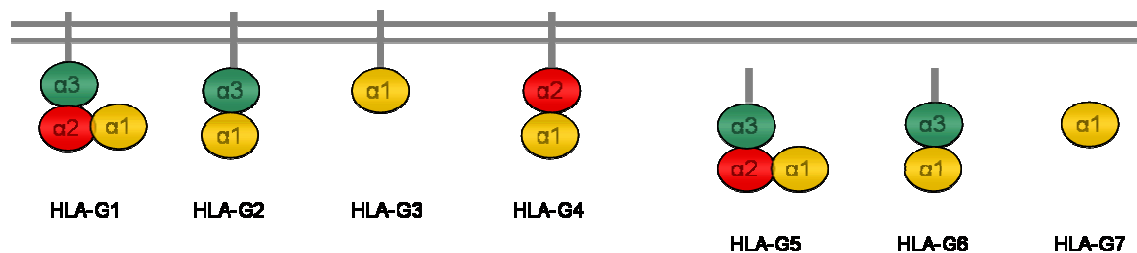


Abbildung 7: Proteinisoformen von *HLA-G*. Durch alternatives Spleißen der *HLA-G* mRNA können sieben verschiedene Proteinisoformen synthetisiert werden. Dargestellt sind je nach Zusammensetzung der einzelnen Isoformen die Transmembranregion sowie die Domänen  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$ . Während die

Isoformen HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 und HLA-G4 membranständig sind, können die löslichen Isoformen HLA-G5, HLA-G6 und HLA-G7 sezerniert werden. Ob die verkürzten, membranständigen Isoformen HLA-G2, -G3 und G4 auch auf der Zelloberfläche exprimiert werden ist noch nicht vollständig geklärt (Angelehnt an Hviid 2006).

### 1.3.4 Polymorphismen im HLA-G-Gen und HLA-G-Promotor

Während die klassischen HLA-Gene mit den größten Polymorphismus im menschlichen Genom aufweisen, ist der Polymorphismus in der kodierenden Region von *HLA-G* gering. Bislang sind, einschließlich zweier Nullallele (*HLA-G\*0105N* und *HLA-G\*0113N*), 36 Allele bekannt (HLA Informatics Group 2008). Diese kodieren für vierzehn Polypeptidvarianten (*HLA-G\*0101* bis *HLA-G\*0116*) und deren verschiedene Subtypen, die aufgrund von stillen Mutationen ohne Änderung der Aminosäuresequenz unterschieden werden. Das Nullallel *HLA-G\*0105N* resultiert aus einer Basendeletion in Codon 130 (Exon 3), die zu einer Leserasterverschiebung führt (Ober et al. 1996, Hviid et al. 1997). Ein weiteres kürzlich entdecktes Nullallel, *HLA-G\*0113N*, besitzt aufgrund eines Basenaustausches (232C→T) ein Stoppcodon in Exon 2 (Lajoie et al. 2008). Die Expression von HLA-G auf der Zelloberfläche erfolgt jeweils biallelisch (Hviid et al. 1998).

Überraschenderweise gibt es im Bereich der Promotorregion (5'-upstream regulatory region, 5'URR) von *HLA-G* jedoch eine außergewöhnlich hohe Zahl an Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNP) (Tan et al. 2005). Bislang konnten 27 verschiedene SNP in der Region 1500 bp stromaufwärts von Exon 1 identifiziert werden. Diese liegen z. T. in Regulationssequenzen und in der Nähe funktioneller Elemente (siehe Abbildung 8) und könnten auf die Expression von HLA-G Einfluss nehmen (Hviid et al. 2003, Ober et al. 2003).

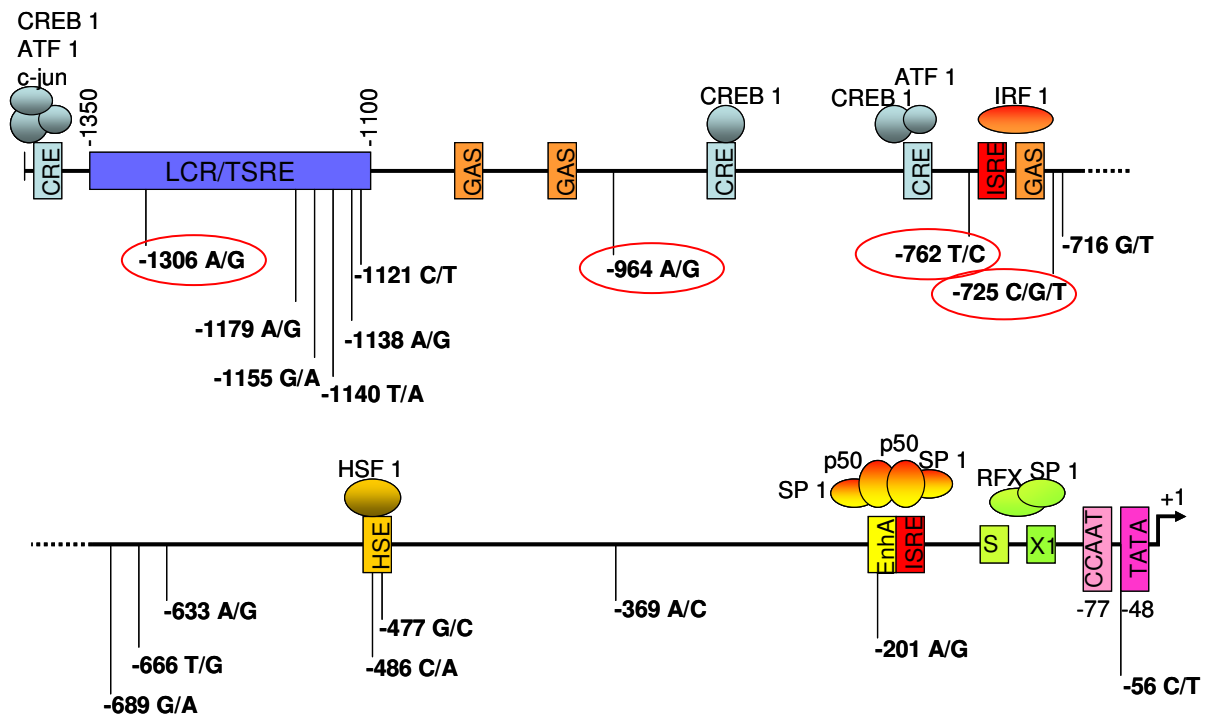


Abbildung 8: 5'-regulatorische Region von *HLA-G*. Eingezeichnet sind 18 von 27 bekannten SNP aus der 5'-regulatorischen Region von *HLA-G*. SNP, die im Rahmen dieser Arbeit typisiert wurden, sind rot umkreist. Bekannte Regulationselemente und ihre Transkriptionsfaktoren sind farbig hervorgehoben. Das stromaufwärts des SNP -725 gelegene Regulationselement GAS sowie das stromabwärts des SNP -201 gelegene ISRE sind allerdings nicht aktiv. TATA= TATA box, CCAAT= CAAT box, S/X1= Pan HLA regulatory elements, RFX= RFX transcription factor, SP1= SP1 transcription factor, ISRE= interferon-specific regulatory element, EnhA= Enhancer A, HSE= heat shock protein element, HSF1= heat shock factor-1 GAS= Gamma interferon activated site, LCR= locus control region, TSRE= tissue specific regulatory element, IRF1= interferon response factor 1, CRE= cAMP-response element, CREB1= cAMP-response element-binding protein 1, ATF1= activation transcription factor 1. (Angelehnt an Gobin et al. 2002 und Ober et al. 2006)

*HLA-G* weist im Hinblick auf die Regulation der Expression wesentliche Unterschiede zu allen anderen HLA-Klasse-I-Genen auf. Während die regulatorischen Elemente für die Klasse-Ia-Gene auf einen Bereich von ca. 500 bp stromaufwärts von Exon 1 verteilt sind, erstreckt sich dieser bei *HLA-G* auf eine Region dreifacher Ausdehnung (Schmidt et al. 1993). Es wird angenommen, dass ein Bereich, der sich zwischen 1,1 und 1,4 kb proximal des Transkriptionsstarts erstreckt, als Locus-Kontrollregion (locus control region, LCR) fungiert (Moreau et al. 1997). In dieser Region konnten bisher sechs SNP identifiziert werden. Darunter befindet sich auch der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Polymorphismus an Position -1306 relativ zum Startpunkt der Translation ATG in Exon 1 (Hviid et al. 1999). Der SNP an Position -964 konnte in einer Studie mit dem Erkrankungsrisiko für Asthma in Verbindung gebracht werden, und der ebenfalls untersuchte SNP an Position -725 wurde mit einem höheren Risiko für Spontanaborte

(spontaneous abortion, SA) korreliert (Pfeiffer et al. 2001, Ober et al. 2003, Nicolae et al. 2005).

Weiterhin sind im Vergleich zu den HLA-Klasse-Ia-Genen nur die CCAAT-Box und die TATA-Box konserviert, während andere, wichtige funktionelle Elemente wie die Enhancer-A-Sequenz und die Interferon-Konsensussequenz (ICS) aufgrund von Deletionen nicht funktionsfähig sind (Solier et al. 2001). Im 3'-untranslatierten Bereich von Exon 8 ist insbesondere ein möglicherweise funktioneller 14-bp-Insertions-Deletions-(Indel)-Polymorphismus an der Nukleotidposition 3741 der Referenzsequenz von Geraghty et al. von Interesse (Harrison et al. 1993). Obwohl das Insertionsallel als evolutionär älter anzusehen ist, wie Studien mit Primaten belegen, kommt das Deletionsallel in allen untersuchten Populationen häufiger vor (Castro et al. 2000). Die Frequenz in der kaukasischen Bevölkerung wird in der Literatur mit Werten zwischen 0,55 und 0,68 angegeben (Hviid 2006, Glas et al. 2007, National Center for Biotechnology Information 2008).

In Studien an Trophoblastzellen fielen *HLA-G*-Allele, welche die 14-bp-Sequenz enthalten (Insertionsallel), durch eine geringere mRNA-Menge im Vergleich zu Allelen ohne die 14-bp-Sequenz (Deletionsallel) auf (Hiby et al. 1999, Hviid et al. 2003). Zudem fehlten den meisten mRNA-Isoformen der von Hviid et al. untersuchten *HLA-G*-Insertionsallele die ersten 92 bp in Exon 8. Deshalb wird von dieser Arbeitsgruppe angenommen, die 14-bp-Sequenz sei für die Bildung der -92-bp-Transkripte nötig indem sie z.B. als kryptische Branchpoint-Sequenz für den Spleißvorgang fungiert. Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass die -92-bp-Transkripte stabiler als die vollständige mRNA sind (Rousseau et al. 2003). Auch auf der Expressionsebene war eine signifikante Reduktion von *HLA-G* nachzuweisen, sofern die Trophoblastzellen ein Insertionsallel kodierten (Hviid et al. 2003). Eine verminderte *HLA-G* Expression konnte bislang mit den schwangerschaftsassozierten Krankheitsbildern Präeklampsie und habitueller Abort (recurrent spontaneous abortion, RSA) sowie einer geringeren Implantationsrate nach In-vitro-Fertilisation in Zusammenhang gebracht werden (Colbern et al. 1994, Aldrich et al. 2001, Noci et al. 2005). Die Expressionsrate von *HLA-G*-Molekülen auf Trophoblasten und folglich auch einige pathologische Prozesse während der Schwangerschaft könnten daher mit Polymorphismen im *HLA-G*-Gen und in der *HLA-G*-Promotorregion assoziiert sein.

### 1.3.5 Die Gewebeverteilung und Funktion von HLA-G

HLA-G wird im Gegensatz zu den klassischen HLA-Klasse-I-Molekülen nicht auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert, sondern weist eine stark beschränkte Gewebeverteilung auf. Der Hauptexpressionsort von HLA-G sind die extravillösen Trophoblasten der Plazenta (Kovats et al. 1990). Der aus semiallogenem Gewebe bestehende, extravillöse Zytotrophoblast bildet denjenigen Anteil der Plazenta, der tief in die Dezidua einbricht, und dort in engem Kontakt zu den Zellen des mütterlichen Immunsystems steht.

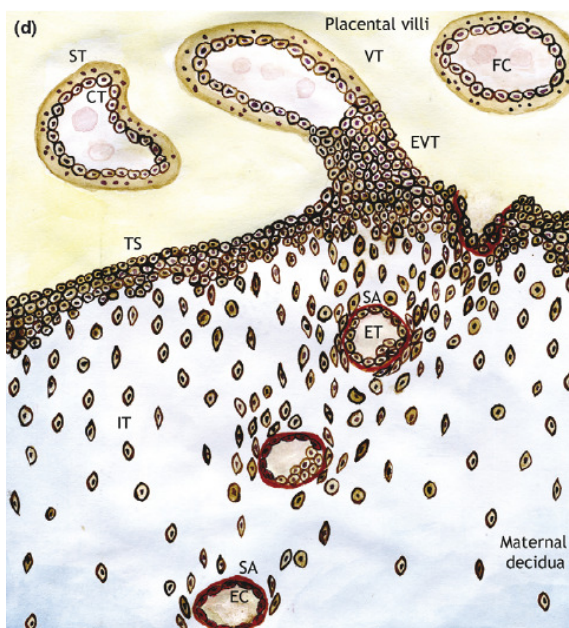


Abbildung 9: Fetomaternale Grenzzone. Am oberen Bildrand sind die Plazentazotten (Placental villi), in denen das fetale Blut (FC) fließt, zu sehen. Zwei Arten von Zellen des villösen Trophoblast (VT) bilden die Zottenwand: Zytotrophoblasten (CT) und Synzytiotrophoblasten (ST). Mütterliches Blut aus den Spiralarterien (SA) der Dezidua füllt den intervillösen Raum (gelb). In der Bildmitte ist eine Haftzotte, gebildet aus Zellen des extravillösen Trophoblast (EVT), dargestellt. Mehrere Haftzotten konfluieren zu einer Zellschicht (TS) aus extravillösen Trophoblasten, die die Grenzzone zu den Zellen der mütterlichen Dezidua bilden. Ausgehend von dieser Schicht invadieren Zellen des extravillösen Trophoblast als interstitielle Trophoblasten (IT) die Dezidua und ersetzen als endovaskuläre Trophoblasten (ET) die Endothelzellen (EC) der Spiralarterien. (Angelehnt an Apps et al. 2008)

Die hauptsächliche Expression von HLA-G an der fetomaternalen Grenzzone (fetomaternal interface) legt nahe, dass dieses HLA-Klasse-Ib-Molekül eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der mütterlichen Immuntoleranz gegenüber dem semiallogenen Feten und der fetalen Anteile der Plazenta spielt.

In der Plazenta werden neben HLA-G nur noch HLA-E, HLA-F und, als einziges klassisches HLA-Molekül, in geringem Ausmaß das weniger polymorphe HLA-C-Molekül von den extravillösen Trophoblasten exprimiert (King et al. 2000). HLA-A, HLA-B und die HLA-Klasse-II-Moleküle fehlen hingegen gänzlich auf den extravillösen Trophoblastzellen (Hutter et al. 1996). Die in unmittelbarem Kontakt zum mütterlichen Blut stehenden Zellen des villösen Trophoblast, die villösen Zytotrophoblasten und die Synzytiotrophoblasten, exprimieren gar keine HLA-Moleküle (Apps et al. 2008). Es wird angenommen, dass die Nicht-Expression wichtiger väterlicher HLA-Allele den Fetus vor der möglichen Aktivierung mütterlicher CTL und der folgenden Abstoßungsreaktion durch das Immunsystems schützt (Hunt et al. 2005). Allerdings wäre ferner zu erwarten, dass eine mangelhafte HLA-Präsentation im Sinne des „missing self“ die Zerstörung von Trophoblastzellen durch die in der Dezidua massenhaft vorkommenden, natürlichen Killerzellen zur Folge hätte. Dies wird wahrscheinlich durch die immunmodulatorische Funktion von HLA-G (und HLA-E) verhindert (Llano et al. 1998). HLA-G kann an die inhibitorisch wirkenden Rezeptoren LIR-1 (leukocyte Ig-like receptor 1), LIR-2 und KIR2DL4 (killer Ig-like receptor 2DL4) binden und dadurch mit verschiedenen Zellen des Immunsystems wie natürlichen Killerzellen, B- und T-Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen interagieren (Hviid 2006). Es wurde mehrfach gezeigt, dass die Expression von HLA-G auf Trophoblastzellen, über die Bindung an den auf allen natürlichen Killerzellen vorkommenden inhibitorischen Rezeptor KIR2DL4, einer durch natürliche Killerzellen vermittelten Lyse entgegenwirken kann (Ponte et al. 1999, Rajagopalan und Long 1999, Riteau et al. 2001, Menier et al. 2002). Weiterhin hat HLA-G über die LIR-1- und KIR2DL4-Rezeptoren auch auf die CTL-vermittelte Lyse einen inhibitorischen Effekt (Rouas-Freiss et al. 1999). Für HLA-G1 konnte auch eine Hemmung der Antigen-spezifischen CTL-Antwort gezeigt werden (Le Gal et al. 1999). Die lösliche Isoform HLA-G5 kann außerdem über die Interaktion mit dem CD8-Rezeptor die Apoptose aktivierter CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten bewirken (Fournel et al. 2000).

Auch für eine Beteiligung von HLA-G an der schwangerschaftstypischen Verschiebung des Zytokinprofils gibt es mittlerweile Anhaltspunkte. Während der Schwangerschaft überwiegt die so genannte Th2-Immunantwort gegenüber der Th1-Immunantwort (Yip et al. 2006). Diese wird von T-Helfer-Zellen vom Typ2 durch die Ausschüttung bestimmter Zytokine wie Interleukin-3 (IL-3), IL-4 und IL-10 vermittelt. Sie führt zu einer Stimulation der Antikörperproduktion der B-Lymphozyten und damit der



humoralen Immunität. Eine Verschiebung des Zytokinprofils hin zu einer proinflammatorischen Th1-Antwort (diese wird durch die Zytokine Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-2 und Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) vermittelt) wurde beispielsweise bei Frauen, deren Schwangerschaft durch Präeklampsie oder habituelle Aborte verkompliziert wurde, beobachtet (Chaouat et al. 2004). Die Verschiebung des Zytokinprofils wird auch für die Tatsache als Erklärung herangezogen, dass einige Autoimmunerkrankungen während der Schwangerschaft eine deutliche Besserung zeigen, während die Schwangerschaft bei anderen regelhaft zu einer Verstärkung der Krankheitsaktivität führt. Vorwiegend Th1-vermittelte Autoimmunerkrankungen wie die Rheumatoide Arthritis oder die Multiple Sklerose erfahren während einer Schwangerschaft in der Regel eine Besserung sowie einen postpartalen Krankheitsschub. Umgekehrt verhält es sich bei den vorwiegend Th2-vermittelten Autoimmunerkrankungen zu denen etwa der systemische Lupus erythematoses zählt (Elenkov und Chrousos 2002). HLA-G könnte durch Interaktion mit den LIR-1- und LIR-2-Rezeptoren in der Lage sein, Einfluss auf die Zytokinsekretion zu nehmen. In mehreren Studien mit HLA-G1 transfizierten Zelllinien konnte nach Zugabe von peripheren mononukleären Zellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) oder uterinen mononukleären Zellen (uterine mononuclear cells, UMC) eine Herunterregulation der proinflammatorischen Th1-Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  beobachtet werden (Maejima et al. 2007, Kanai et al. 2001, Kanai et al. 2002). Eine Hochregulation der Th2-Zytokine IL-10 und IL-4 konnte allerdings nur nach Zugabe von PBMC bestimmt werden, während nach Zugabe von UMC keine Hochregulation der Th2-Zytokine erfolgte (Kanai et al. 2002, Rieger et al. 2002). IL-10 ist wiederum in der Lage die HLA-G Expression auf Trophoblasten und PBMC hoch zu regulieren und übt über die Hemmung der allospezifischen Zytotoxizität eine wichtige antientzündliche Funktion aus (Moreau et al. 1999).

Es gibt auch Hinweise darauf, dass HLA-G positive antigenpräsentierende Zellen durch Unterdrückung der Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, Förderung von T-Zell-Anergie und Bildung von Suppressorzellen, zu einer Hemmung der Immunantwort beitragen können (Le Maoult et al. 2004). HLA-G besitzt darüber hinaus die Fähigkeit, intrazelluläre Peptide zu binden, und es gibt Anhaltspunkte, dass das Molekül auch in der Lage ist, diese gegenüber dem T-Zell-Rezeptor auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu präsentieren. Ähnlich wie die klassischen HLA-Klasse-I-Moleküle könnte HLA-G in der Plazenta somit auch eine gewisse Schutzfunktion gegenüber viralen Infektionen ausüben (Lenfant et al. 2003).

Neben den Trophoblastzellen exprimieren unter physiologischen Bedingungen vor allem Thymusepithelzellen und aktivierte Monozyten HLA-G (Crisa et al. 1997). Lösliches HLA-G1 (HLA-G5) ist im Blutplasma nachweisbar und wird wahrscheinlich von den Blutmonozyten sezerniert (Rebmann et al. 2003). HLA-G mRNA konnte in geringen Mengen bislang auch in anderen Geweben wie z.B. Keratinozyten, Nagelmatrix, und Kornea nachgewiesen werden (Ulbrecht et al. 1994, Le Discorde et al. 2003, Ito et al. 2005). In jüngster Zeit wurde allerdings Kritik an der Nachweismethode der HLA-G Expression mittels wenig spezifischer monoklonaler Antikörper laut und der definitive Nachweis einer HLA-G Expression ausserhalb der extravillösen Trophoblasten durch Analyse der schweren Kette des HLA-G-Moleküls gefordert (Apps et al. 2008).

Unter pathologischen Bedingungen konnte eine HLA-G Expression durch zahlreiche Tumorzellen, z.B. in kutanen B- und T-Zell Lymphomen, malignen Melanomen, Ovarialkarzinomen, Mammakarzinomen, Bronchialkarzinomen und Gliomen beobachtet werden (Wiendl et al. 2002, Rouas-Freiss et al. 2005). Es wird vermutet, dass die Tumorzellen HLA-G zum Schutz vor den Zellen des Immunsystems exprimieren. An Melanomzellen konnte gezeigt werden, dass eine HLA-G Expression eine Lyse durch natürliche Killerzellen und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten verhindern kann und eine Blockierung mit monoklonalen Antikörpern gegen HLA-G1 diesen Schutzeffekt wieder aufhebt (Paul et al. 1998).

Auch bei einigen entzündlichen Erkrankungen mit teils autoimmunologischer Genese konnte eine HLA-G Expression und/oder eine Assoziation mit bestimmten *HLA-G*-Allelen nachgewiesen werden. Dazu gehören so verschiedene Krankheitsbilder wie Asthma bronchiale, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Multiple Sklerose, atopische Dermatitis, Pemphigus vulgaris und Psoriasis (Nicolae et al. 2005, Torres et al. 2004, GAMES 2003, Soderhall et al. 2001, Khosrotehrani et al. 2001, Zhang et al. 2002, Aractingi et al. 2001). Obwohl die Rolle von *HLA-G* für die Pathogenese dieser Krankheitsbilder noch völlig unklar ist, kann über eine mögliche immunmodulatorische Funktion von HLA-G auch bei entzündlichen Prozessen spekuliert werden. Nach allogenen Organtransplantationen konnte eine HLA-G Expression in den Spenderorganen, sowie der Nachweis von löslichem HLA-G im Blut des Empfängers, mit einer besseren Prognose bezüglich des Ausbleibens einer Abstoßungsreaktion korreliert werden (Lila et al. 2000, Creput et al. 2003). Ähnlich wie dem semiallogenen Embryo

könnte die HLA-G Expression in Spenderorganen einen Schutz vor der Immunantwort des Empfängers auf genetisch fremdes Gewebe bieten.

## 2. Zielsetzung

Obwohl mit der Identifizierung von Kollagen Typ XVII als gemeinsamem Zielantigen von Pemphigoid gestationis und bullösem Pemphigoid ein wichtiger Schritt zur Klärung der Ätiopathogenese des Pemphigoid gestationis beigetragen werden konnte, ist der eigentliche Auslöser der Erkrankung nach wie vor unklar. Eine gewisse genetische Prädisposition für Trägerinnen bestimmter HLA-DR-Allele gilt aber als gesichert. Die Untersuchung einer möglichen Assoziation mit dem nicht-klassischen MHC-Klasse-I-Molekül HLA-G war bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht beschrieben worden.

Seit seiner Entdeckung im Jahre 1989 ist das *HLA-G*-Gen Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten. Diese konnten neben der teilweisen Klärung seiner wichtigen Rolle bei der Tolerierung des semiallogenen Feten während der Schwangerschaft auch eine mögliche Beteiligung bei der Steuerung zahlreicher pathologischer Prozesse wie z. B. Tumorerkrankungen und entzündlicher Prozesse aufdecken. Dabei waren auch Assoziationen bestimmter Genpolymorphismen mit verschiedenen Krankheitsbildern aufgefallen. Für die blasenbildende Autoimmunerkrankung Pemphigus vulgaris konnten Gazit et al. (2004) beispielsweise einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein eines 14-bp-Insertions-Deletions-Polymorphismus in Exon 8 von *HLA-G* und dem Erkrankungsrisiko feststellen.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollte deshalb ein möglicher Einfluss von Polymorphismen im *HLA-G*-Gen und dessen Promotor auf das Erkrankungsrisiko für Pemphigoid gestationis untersucht werden. Dazu sollten Pemphigoid-gestationis-Patientinnen hinsichtlich der ausgewählten Polymorphismen typisiert und mit einem Kontrollkollektiv auf statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Genotyp- und Allelfrequenzen verglichen werden. Ein Vergleich der ermittelten Genotyp- und Allelfrequenzen mit den aus der Literatur bekannten Daten sollte ebenfalls angestellt werden.

Da ein Einfluss des HLA-Klasse-II-Typs des Vaters auf das Erkrankungsrisiko der Mutter erwiesen ist, und der Auslöser des Pemphigoid gestationis von vielen Autoren im semiallogenen Gewebe des Feten vermutet wird, sollten auch die Partner und Kinder der Pemphigoid-gestationis-Patientinnen in die genetische Untersuchung miteinbezogen werden. Für die Typisierung wurden aufgrund bereits bekannter klinischer Assoziationen, und/oder ihrer Lage innerhalb oder in der Nähe funktioneller

Promotorelemente, die Promotorpolymorphismen -1306 G/A (rs1736936), -964 G/A (rs1632947), -762 C/T (rs1632946), -725 C/G/T (rs1233334) sowie der 14-bp-Indel-Polymorphismus in Exon 8 (rs1704) ausgewählt.

## **3. Material**

### **3.1 Studienkollektiv**

#### **3.1.1 Patientenkollektiv**

Das Patientenkollektiv umfasste 18 Patientinnen mit Pemphigoid gestationis, welche sich in ambulanter Betreuung in der Spezialsprechstunde für Autoimmundermatosen der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München befanden. In einigen Fällen wurden auch Blut- und Gewebeproben von auswärts betreuten Patientinnen, die aus diagnostischen Gründen an das Labor für Autoimmundiagnostik überwiesen wurden, verwendet. Die Diagnose Pemphigoid gestationis wurde anhand klinischer, histologischer, serologischer und immunologischer Kriterien gesichert. Zur Überprüfung möglicher genetischer Einflussfaktoren konnten insgesamt 22 DNA-Proben von Partnern und Kindern der betroffenen Frauen gewonnen werden. Als Material zur DNA-Isolierung wurde venös entnommenes Vollblut nach schriftlichem Einverständnis verwendet.

#### **3.1.2 Kontrollkollektiv**

Als Kontrollkollektiv dienten 52 DNA-Proben von gesunden, nicht verwandten Blutspenderinnen. Diese DNA-Proben stammen vom Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes und wurden durch das Forschungslabor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie bereitgestellt.

### **3.2 Kits und Chemikalien**

#### **3.2.1 Materialien für die DNA-Isolierung**

- S-Monovette® 9 ml EDTA Sarstedt
- DNA-Isolierungskit Nucleospin® Blood XL Macherey-Nagel

- Isopropylalkohol (2-Propanol)	Merck
- Ethanol absolut	Merck
- Erythrozytenlysepuffer	155 mM NH <sub>4</sub> Cl, 10 mM KHCO <sub>3</sub> , 1 mM EDTA
- Kernlysepuffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 400 mM NaCl 10 mM EDTA
- gesättigte Natriumchloridlösung	5 M NaCl
- Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung	20%
- TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA

### 3.2.2 Materialien für die Polymerasekettenreaktion

- Aqua ad injectabilia	Braun
- Deoxynukleotid-Mix(dNTP) (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Sigma
- HotStar <i>Taq</i> <sup>TM</sup> DNA-Polymerase	Qiagen
- <i>Taq</i> DNA-Polymerase	Agrobiogen
- PCR-Puffer 10 ×	Qiagen Amersham Pharmacia

### 3.2.3 Materialien für den Restriktionsverdau

- Restriktionsenzyme

New England Biolabs

Restriktionsenzym	Reaktionsbedingungen	Schnittstelle
<i>Pst</i> I (10 U/ $\mu$ l)	10 x Reaktionspuffer NEB 3 BSA 100 x (10 mg/ml) 37°C	5' CTGCAIG 3' GIACGTC
<i>Mlu</i> I (10 U/ $\mu$ l)	10 x Reaktionspuffer NEB 3 37°C	5' AICGCGT 3' TGCGCIA
<i>Dra</i> III (10 U/ $\mu$ l)	10 x Reaktionspuffer NEB 3 BSA 100 x (10 mg/ml) 37°C	5' CACNNNIGTG 3' GTGINNNCAC
<i>Stu</i> I (10 U/ $\mu$ l)	10 x Reaktionspuffer NEB 2 37°C	5' AGGICCT 3' TCCIGGA
<i>Hyp</i> CH4 IV (10 U/ $\mu$ l)	10 x Reaktionspuffer NEB 1 37°C	5' AICGT 3' TGCIA

Tabelle 1: Aufgelistet sind die verwendeten Restriktionsenzyme, die jeweiligen Reaktionsbedingungen sowie die Sequenz der Schnittstelle.

- Reaktionspuffer 10 x

New England Biolabs

NEB 1:

100 mM Bis/Tris/Propan/HCl

pH 7,0

100 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM Dithiothreitol

NEB 2:

100 mM Tris/HCl pH 7,9

500 mM NaCl

100 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM Dithiothreitol



NEB 3:	500 mM Tris/HCl pH 7,9
	1000 mM NaCl
	100 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM Dithiothreitol
- BSA 100 × (10 mg/ml)	New England Biolabs

### 3.2.4 Materialien für die Agarosegelelektrophorese

- DNA-Molekulargrößenstandard 1 kb+	Invitrogen
- Agarose Typ I-A	Sigma
- Agarose NuSieve	Cambrex
- Ethidiumbromid	Sigma
- Polaroidfilm Typ 667	Polaroid
- 10 × TBE:	890 mM Tris
	890 mM Borsäure
	20 mM EDTA pH 8,0
- DNA-Auftragspuffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0
	2 mM EDTA
	20% Ficoll
	0,25% Orange G

### 3.3 Oligonukleotid-Primer

Die hier aufgelisteten Primer wurden von der Firma TIB-MOLBIOL, Berlin synthetisiert. Da sie lyophilisiert geliefert wurden, mussten sie erst entsprechend den Herstellerangaben durch Zugabe einer definierten Menge an Aqua ad injectabilia gelöst

werden. Die Endkonzentration betrug dann bei allen Primern 100 pmol/ $\mu$ l. Ausgehend von diesen Lösungen wurden jeweils Arbeitsverdünnungen mit einer Konzentration von 5-10 pmol/ $\mu$ l hergestellt. Alle Oligonukleotide wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Angegeben sind jeweils Name und Sequenz der verwendeten PCR-Primer, der 5'-Primer ist immer zuerst genannt.

### 3.3.1 Primer zur Genotypisierung des 14-bp-Insertions-Deletions-Polymorphismus

Bezeichnung	Sequenz 5' $\rightarrow$ 3'
HLA-G1	GTAGTGTGAAACAGCTGCC
HLA-G2	AAGGAATGCAGTTCAGCATGA

Tabelle 2: Name und Sequenz der verwendeten PCR-Primer.

### 3.3.2 Primer zur Genotypisierung der HLA-G-Promotorpolymorphismen

Bezeichnung	Sequenz 5' $\rightarrow$ 3'
HLAG1306F2	CAGGTCATGGAACAGTGCTAGAGCTGCA
HLAG1306R	CCTCTGCTCCTTTTCCTCACCTCCTGC
HLAG964F2	TCACATGTGGATACTTCCTAAAAACAGGCAACGC
HLAG964R	GTACCACACTATGTTACTATATGTTGCAACCAGG
HLAG762F	CATAGTGTGGTACTTTGTCTTGAGGAGATGTCC
HLAG762R	GACTCACAAAGCTCTTAAGTTTCACTTTCCCAACA
HLAG725F2	GTCTGGGAAAGTGAAACTTAAGAGCTTTGTGAGGC
HLAG725R	CTTGGTAACCCCTGAATGATCAGGAATC
HLAG725F3	GTCTGGGAAAGTGAAACTTAAGAGCTTTGTGAGAC
HLAG725R	CTTGGTAACCCCTGAATGATCAGGAATC

Tabelle 3: Name und Sequenz der verwendeten Primer.

Die farbig unterlegten Basen unterscheiden sich von der Originalsequenz und dienen dem Einbau des Erkennungsmotivs für das verwendete Restriktionsenzym.

### 3.4 Geräte

Brutschränke	Memmert und Techne
Elektrophoresekammer	Sub-cell <sup>®</sup> GT, BioRad
Mikrowellenofen	Bosch
Polaroidkamera	MP-4 Land Camera
Rotator	Bachofer
Spannungsquelle	Power Pac 300, BioRad
Spectrophotometer	GeneQuant pro, Amersham Pharmacia BioFotometer, Eppendorf AG
Thermocycler	Uno-Thermoblock, Biometra GeneAmp9600, Perkin Elmer Omn-E Hybaid, MWG-Biotech Mastercycler, Eppendorf AG Techne Progene, Thermo-Dux
UV-Transilluminatoren	LK Bromma Bachofer
Vortex-Schüttler	Heidolph
Wasserbad	Julabo
Zentrifugen	Rotixa/P, Universal 30RF, Hettich Biofuge fresco, Megafuge 1.0, Suprafuge 20, Heraeus Sepatech Modell SD und Modell AL, Roth

## 4. Methoden

### 4.1 Allgemeine Vorgehensweise

Es wurden vier Einzelnukleotidpolymorphismen der Promotorregion (rs1736936, rs1632947, rs1632946, rs1233334) und ein 14-bp-Insertions-Deletions-Polymorphismus im 3'-untranslatierten Bereich von Exon 8 des *HLA-G*-Gens (rs1704 früher rs16375) in der Studienpopulation untersucht. Die Bezeichnung gibt jeweils die Entfernung des SNP in Basenpaaren vom Startpunkt der Translation ATG in Exon 1 bzw. in Klammern die Erkennungsnummer in der Genbank-Referenzsequenz des National Center for Biotechnology Information (NCBI) an. Als Ausgangsmaterial diente aus venösem Vollblut gewonnene DNA. Zur Genotypisierung wurden die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) und nachfolgend die Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse) eingesetzt. Dabei wurde zunächst mittels PCR ein DNA-Abschnitt, welcher den jeweils zu untersuchenden Polymorphismus enthält, amplifiziert. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt mit einem Restriktionsenzym, dessen Schnittstelle nur im Falle einer der möglichen Allelvarianten vorhanden ist, verdaut. Die so entstandenen Restriktionsfragmente wurden mit Hilfe eines Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bestimmung des Genotyps erfolgte dann anhand des Bandenmusters. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Pemphigoid gestationis und den untersuchten Polymorphismen aufzudecken, wurden Genotyp- und Allelfrequenzen von Patientinnen-, Angehörigen- und Kontrollkollektiv schließlich mittels des Exakten Tests nach Fisher verglichen.

### 4.2 Molekularbiologische Methoden

#### 4.2.1 Isolierung genomischer DNA

##### DNA-Isolierung nach der Aussalzmethode

Ausgangsmaterial war mit EDTA versetztes Blut (S-Monovette® 9 ml EDTA, Sarstedt). Aus den Blutröhrchen wurden jeweils 9 ml Blut entnommen und mit dem 3-fachen Volumen Erythrozytenlysepuffer (155 mM NH<sub>4</sub>CL, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA) versetzt. Nun wurde die Suspension bei Raumtemperatur 10 min auf einem

Rotator (Bachofer) bewegt, bis die Erythrozyten vollständig lysiert und eine durchsichtige Lösung entstanden war. Die nach diesem Schritt noch intakten Leukozyten wurden bei 2000 rpm 5 min lang abzentrifugiert (Rotixa/P, Hettich), der Überstand verworfen und das Sediment in 3 ml Kernlysepuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 400 mM NaCl, 10 mM EDTA) suspendiert und dabei lysiert. Durch gleichzeitige Zugabe von 100 µl 20% SDS (Natriumdodecylsulfat) erfolgte die Degradierung von Membranbestandteilen der Zelle und des Zellkerns. Das ebenfalls zeitgleich erfolgte Hinzufügen von 150 µl Proteinase K (4 mg/ml) diente dem Proteinverdau. Die Lösung wurde zur vollständigen Lyse schließlich bei 37°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Lösung mit 1 ml gesättigtem (5 M) NaCl versetzt und auf dem Vortexschüttler kräftig gemischt um eine Scherung der DNA zu erreichen. Um Proteinabbauprodukte und Membranbestandteile zu sedimentieren, wurde die Lösung für 30 min auf Eis gekühlt und anschliessend zweimal bei 3000 rpm für jeweils 15 min zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde mit dem 0,6-fachen Volumen Isopropanol versetzt. Durch anschließende langsame Mischung fiel die DNA fadenförmig aus und konnte aus der Lösung entnommen werden. Es folgte eine zweimalige Waschung mit 70%igem Ethanol und die anschließende Lufttrocknung. Die so gewonnene DNA wurde in 200 µl TE (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA) gelöst, und ihre Konzentration mittels der Messung der optischen Dichte bei 260nm ( $OD_{260}$ ) bestimmt. Die Aufbewahrung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20°C.

#### DNA-Isolierung mit Nucleospin® Blood XL

Mit Hilfe des DNA-Isolierungskits Nucleospin® Blood XL (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) konnten aus jeweils 10 ml Blut 200-300 µg DNA gewonnen werden. Es wurde nach Anleitung des Herstellers vorgegangen. Die Aufbewahrung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20°C.

#### **4.2.2 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren**

Nukleinsäuren zeigen ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Ihre Konzentration lässt sich deshalb mittels eines Spektralfotometers bestimmen.

Dazu wurde zunächst eine Verdünnung der DNA-Lösung von 1:100 hergestellt. Die fotometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte nun durch die Messung der Extinktion bei 260 nm gegen H<sub>2</sub>O als Nullwert in einer Quarzküvette. Die erhaltenen

OD<sub>260</sub>-Werte sollten dabei in einem Bereich zwischen 0,05 und 0,8 liegen, da nur in diesem Bereich eine lineare Beziehung zwischen Nukleinsäurekonzentration und gemessener Extinktion besteht. Die Konzentration der Nukleinsäure konnte im Anschluss mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet werden:

$$c = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \varepsilon \times d^{-1}$$

c = Nukleinsäurekonzentration (ng/μl)

OD<sub>260</sub> = gemessene Extinktion bei 260 nm

d = Schichtdicke in cm (bei der verwendeten Quarzküvette gilt d= 1)

ε = Extinktionskoeffizient (für dsDNA gilt ε= 50, für RNA ε= 40)

### 4.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mittels der Technik der Polymerasekettenreaktion ist es möglich einen kurzen, genau definierten Abschnitt einer DNA-Sequenz zu vervielfältigen. Grundlage dieser Methode ist die enzymatische Amplifikation eines DNA-Abschnittes. Dieser wird von zwei Oligonukleotid-Primern flankiert, die komplementär zum 5'- bzw. 3'- Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments sind. Die Oligonukleotid-Primer ermöglichen nun der *Taq*-Polymerase die Amplifikationsreaktion zu starten. Die *Taq*-Polymerase ist eine aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isolierte DNA-Polymerase. Da thermophile Bakterien sehr hohen Temperaturen widerstehen können, ist auch deren DNA-Polymerase thermostabil und wird beim Erhitzen während der PCR-Zyklen nicht zerstört. Die Primer legen auf den beiden Einzelsträngen jeweils den Startpunkt für die Replikation durch die *Taq*-Polymerase fest, indem sie der *Taq*-Polymerase die nötigen freien 3'-OH-Gruppen zur Verfügung stellen.

Der nun folgende PCR-Prozess besteht aus einer Anzahl von 30-50 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Jeder Zyklus besteht aus folgenden drei Schritten:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94-96°C um die Stränge zu trennen.
2. Anlagerung der Oligonukleotid-Primer (primer annealing) an die komplementären DNA-Stränge. Dazu wird der Ansatz auf die für die

Oligonukleotide berechnete Anlagerungstemperatur, die typischerweise zwischen 50 und 65°C liegt, abgekühlt.

3. Elongation der angelagerten Oligonukleotid-Primer mit freien Nukleotiden bei 72°C, dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase. Die Verlängerung beginnt jeweils am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang bis der komplementäre Strang ergänzt ist.

Da nach jedem vollendeten Zyklus die neu synthetisierten DNA-Stränge ihrerseits im nächsten Durchgang als Vorlage dienen, folgt daraus eine exponentielle Anreicherung des zu amplifizierenden DNA-Fragments.

Für einen PCR-Ansatz werden ein PCR-Puffer, eine aus den vier dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) bestehende Lösung, zwei für die Zielsequenz spezifische Oligonukleotid-Primer, Magnesiumchloridlösung, *Taq*-Polymerase, speziell gereinigtes Wasser zur Einstellung des Gesamtvolumens sowie die als Matrize dienende Ausgangs-DNA benötigt. Bei jedem PCR-Ansatz wird außerdem eine Negativkontrolle mit Wasser anstelle der Ausgangs-DNA mitgeführt.

Die genaue Zusammensetzung eines 20 µl fassenden PCR-Ansatzes ist der Tabelle 4 zu entnehmen.

Reagenz	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen
<b>PCR-Puffer</b>	10x	1x (= 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	2 µl
<b>dNTP-Mix</b>	10mM	0,2 mM	0,4 µl
<b>5'-Primer</b>	100 µM	0,25 µM	0,05 µl
<b>3'-Primer</b>	100 µM	0,25 µM	0,05 µl
<b>DNA-Polymerase</b>	5 U/µl	0,025 U/µl	0,1 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1,5 mM oder 3 mM oder 4 mM	0 µl 1,2 µl 2 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>			16,4 µl oder 15,2 µl oder 14,4 µl
<b>DNA</b>	100 ng/µl	5 ng/µl	1 µl
<b>Endvolumen</b>			20 µl

Tabelle 4 : PCR-Ansatz. Aufgelistet sind die für den PCR-Ansatz benötigten Reagenzien, ihre Konzentration in der Stammlösung, die Endkonzentration sowie das benötigte Volumen für einen Gesamtvolumen von 20 µl. Die Endkonzentration von MgCl<sub>2</sub> sowie von H<sub>2</sub>O ist dabei von der gewählten Primerpaarkombination abhängig.

Für die PCR wurde teilweise eine Heißstart DNA-Polymerase (HotStarTaq™ DNA-Polymerase, Qiagen) verwendet. Die Heißstart DNA-Polymerase trägt hitzestabile Schutzgruppen und wird erst durch eine 15-minütige Inkubation bei 95°C aktiviert. Durch ihre Verwendung soll das Auftreten unspezifischer Amplifikate minimiert werden.

Die verschiedenen PCR-Bedingungen hinsichtlich der Anlagerungstemperatur und der Magnesiumchloridkonzentration für die verschiedenen Primerpaarkombinationen waren bereits etabliert und sind in Tabelle 5 dargestellt.

<b>Primerpaar</b>	<b>Anfangsdenat.</b>	<b>Denat.</b>	<b>Anlag.</b>	<b>Extension</b>	<b>Endextension</b>	<b>MgCl<sub>2</sub></b>
<b>HLA-G1 HLA-G2</b>	95°C 15 min	94°C 30 s	60°C 30 s	72°C 30 s	72°C 10 min	1,5 mM
	1x	35x			1x	
<b>HLAG1306F2 HLAG1306R</b>	95°C 15 min	94°C 30 s	65°C 30 s	72°C 30 s	72°C 10 min	1,5 mM
	1x	35x			1x	
<b>HLAG964F2 HLAG964R</b>	95°C 15 min	94°C 30 s	65°C 30 s	72°C 30 s	72°C 10 min	3,0 mM
	1x	35x			1x	
<b>HLAG762F HLAG762R</b>	95°C 15 min	94°C 30 s	60°C 30 s	72°C 30 s	72°C 10 min	1,5 mM
	1x	35x			1x	
<b>HLAG725F2 HLAG725R</b>	95°C 15 min	94°C 30 s	65°C 30 s	72°C 30 s	72°C 10 min	4,0 mM
	1x	35x			1x	
<b>HLAG725F3 HLAG725R</b>	95°C 15 min	94°C 30 s	60°C 30 s	72°C 30 s	72°C 10 min	1,5 mM
	1x	35x			1x	



Tabelle 5: PCR-Bedingungen der angegebenen Primerpaarkombinationen. Aufgelistet sind die Bedingungen für Anfangsdenaturierung, Denaturierung, Anlagerung, Extension und Endextension. Außerdem ist angegeben, in welcher Endkonzentration  $MgCl_2$  zugegeben wurde.

Die PCR-Produkte wurden im weiteren Verlauf mit Restriktionsenzymen verdaut (siehe Punkt 4.2.4).

#### 4.2.4 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-(RFLP)-Analyse

Restriktionsenzyme sind bakterielle Enzyme, die DNA an spezifischen Erkennungssequenzen erkennen und schneiden können. Ihre biologische Funktion besteht in der Spaltung fremder, durch Virusinfektion oder Plasmidübertragung in die Bakterienzelle eingedrungener dsDNA. In der Gentechnologie werden zumeist zur Unterklasse der Restriktionsendonukleasen vom Typ II gehörige Restriktionsenzyme verwendet. Sie spalten an beiden Strängen des DNA-Moleküls die Phosphodiesterbindung innerhalb oder neben einer, für das jeweilige Enzym spezifischen, Erkennungssequenz. Die Erkennungssequenz besteht meist aus palindromischen Folgen von vier, sechs oder acht Basenpaaren. Der Schnitt kann je nach verwendetem Enzym versetzt (es entstehen sog. „klebrige Enden“ mit 5'- oder 3'- Überhängen) oder gerade erfolgen (es entstehen sog. „stumpfe Enden“). Durch den Einsatz der Restriktionsenzyme wird es somit möglich spezifische DNA-Fragmente gezielt herzustellen.

Liegt ein bestimmter Polymorphismus innerhalb einer Erkennungsstelle für ein Restriktionsenzym, so kann man ihn durch den Verdau eines PCR-Amplifikats nachweisen, welches die polymorphe Nukleotidposition beinhaltet. Ist jedoch keine komplette Erkennungsstelle vorhanden, so kann diese mittels einer in einzelnen Nukleotiden von der Originalsequenz abweichenden Primersequenz in der PCR eingebaut werden. Dafür wird in unmittelbarer Nachbarschaft des zu typisierenden Nukleotidpolymorphismus eine passende Sequenz ausgesucht, die der Erkennungsstelle des jeweiligen Restriktionsenzym möglichst ähnlich ist. Die polymorphe Nukleotidposition muss dabei Teil der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym sein. Zu beachten ist darüber hinaus, dass keine weiteren Schnittstellen für das verwendete Enzym im Bereich des Amplifikates liegen.

Für diese Arbeit wurde die Methode der RFLP-Analyse eingesetzt um vier SNP in der Promotorregion von *HLA-G* zu typisieren. Die Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass immer nur eines von zwei oder drei möglichen Allelen geschnitten wurde. So

entstanden im Restriktionsverdau verschieden lange Restriktionfragmente, die im Folgenden mittels der Agarosegelelektrophorese visualisiert und dadurch identifiziert werden konnten.

Hierfür wurden 20 µl des zu verdauenden PCR-Amplifikats mit 1/10 Volumen des Gesamtansatzes 10x Restriktionspuffer, dem ausgewählten Restriktionsenzym und falls erforderlich 1/100 bovinem Serumalbumin (BSA) versetzt. Anschließend erfolgte über Nacht die Inkubation bei 37°C.

Für diese Arbeit wurden folgende Bedingungen für die RFLP-Analysen gewählt:

<b>Polymorphismus</b>	<b>Enzym</b>	<b>BSA</b>	<b>Restriktionspuffer</b>	<b>Restriktions- temperatur</b>
<b>-1306 G → A</b>	<i>Pst</i> I	ja	NEBuffer 3	37 °C
<b>- 964 G → A</b>	<i>Mlu</i> I	nein	NEBuffer 3	37 °C
<b>- 762 C → T</b>	<i>Dra</i> III	ja	NEBuffer 3	37 °C
<b>- 725 C → G</b>	<i>Stu</i> I	nein	NEBuffer 2	37 °C
<b>- 725 C → T</b>	<i>Hyp</i> CH4 IV	nein	NEBuffer 1	37 °C

Tabelle 6: Verwendete Restriktionsenzyme sowie Restriktionsbedingungen für die RFLP-Analyse. Aufgelistet sind die verwendeten Restriktionsenzyme, die Endkonzentrationen der Enzyme, die verwendeten Restriktionspuffer sowie die Inkubationstemperatur. Außerdem ist angegeben, ob BSA zugegeben wurde.

#### 4.2.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, mit deren Hilfe in einem elektrischen Feld DNA-Moleküle der Größe nach getrennt werden können. Auch eine annähernde Größen- und Konzentrationsbestimmung ist im Vergleich mit einem Molekulargewichtsstandard (DNA-Leiter) möglich. Dazu wird zunächst aus Agarose und 1x TBE-Puffer (versetzt mit 10 µg/µl Ethidiumbromid) durch Aufkochen im Mikrowellenherd eine Gellösung hergestellt. Diese wird nach Abkühlung auf ca. 55°C in einen abgeklebten Gelträger mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Der Gelträger mit dem erstarrten Agarosegel wird anschließend in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, welche mit ethidiumbromidhaltigem 1x TBE-Puffer gefüllt ist. Danach wird der Probenkamm entfernt und es entstehen Taschen im

Agarosegel. Je nach verwendetem Kamm können nun in jede Tasche 20-60 µl Probe pipettiert werden, welche zuvor mit 1/6 Volumen Auftragspuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 2 mM EDTA, 20% Ficoll 400, 0,25% Orange G) versetzt wurde.

Je höher dabei die Agarosekonzentration im Gel ist, desto feinporiger wird dieses. Für kleine DNA-Fragmente wird daher die Agarosekonzentration höher gewählt. In der Regel beträgt sie zwischen 0,7 und 3,0%. Für diese Arbeit wurden Agarosegele mit Konzentrationen von 2,5 (14-bp-Indel-Polymorphismus) und 3,0% (Promotorpolymorphismen) verwendet.

Sobald die mit Auftragspuffer versetzten Proben in die Geltaschen pipettiert sind, wird eine elektrische Spannung (in der Regel zwischen 50-110 Volt) angelegt. Die negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle werden im elektrischen Feld durch die netzartige Gelmatrix gezogen und bewegen sich zur positiv geladenen Anode. Da die kleineren Moleküle sich schneller durch das Gel bewegen können wird somit die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe möglich. Nach abgelaufener Elektrophorese kann das Gel schließlich unter einer UV-Lampe betrachtet werden um die DNA sichtbar zu machen. Das Ethidiumbromid hat sich in die DNA eingelagert (Interkalation) und fluoresziert im ultravioletten Licht. Zu Dokumentationszwecken kann das Agarosegel fotografiert werden.

Für diese Arbeit wurde die Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung der PCR-Amplifikate und Restriktionsfragmente verwendet. Zur Größenbestimmung der DNA-Stränge wurde ein kommerzieller Längenstandard von 1 kb+ zum Vergleich herangezogen.

### **4.3 Statistische Auswertung**

In der vorliegenden Arbeit wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Krankheitsbild Pemphigoid gestationis und dem Auftreten bestimmter Polymorphismen im *HLA-G*-Gen der betroffenen Frauen und/oder im *HLA-G*-Gen von ihren Partnern und Kindern untersucht. Dazu wurden Patientinnen und Familienangehörige mit einer Kontrollgruppe aus gesunden, unverwandten Individuen verglichen und die Signifikanz der ermittelten Assoziationsstärke berechnet. Die Allel- und Genotypfrequenzen der jeweiligen Gruppen wurden mit Hilfe des Exakten Tests nach Fisher verglichen.

### **4.3.1 Der Exakte Test nach Fisher**

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Patientinnenkollektiv umfasst aufgrund der Seltenheit der Erkrankung lediglich 18 Frauen. Für die statistische Auswertung wurde deshalb der Exakte Test nach Fisher verwendet. Dieser liefert auch für Fallzahlen mit weniger als fünf Beobachtungseinheiten in einem oder mehreren Feldern zuverlässige Ergebnisse. Für die statistischen Berechnungen wurde SAS (Statistical Analysis System) in der Version 9.1.3 verwendet.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Typisierung des 14-bp-Indel-Polymorphismus in Exon 8 von *HLA-G* (rs1704)

Der 14-bp-Indel-Polymorphismus im 3'untranslatierten Bereich in Exon 8 von *HLA-G* (rs1704) wurde erstmals von Harrison et al. (1993) beschrieben. Zu den Allelen, welche die 14-bp-Insertion tragen, zählen *HLA-G\*010102*, *HLA-G\*010103*, *HLA-G\*0103*, *HLA-G\*0105N* und *HLA-G\*0106* (Hviid und Christiansen 2005). Bislang konnte der Polymorphismus mit den schwangerschaftsassozierten Krankheitsbildern habitueller Abort und Präeklampsie, der Implantationsrate nach In-vitro-Fertilisation sowie der blasenbildenden Autoimmunerkrankung Pemphigus vulgaris in Zusammenhang gebracht werden.

Da für diese Arbeit ein möglicher Einfluss des 14-bp-Indel-Polymorphismus auf das Erkrankungsrisiko für Pemphigoid gestationis untersucht werden sollte, wurden zunächst die DNA-Proben der Pemphigoid-gestationis-Patientinnen und deren Angehörigen sowie der Kontrollgruppe mittels PCR und anschließender Agarose-gelelektrophorese typisiert. Die verwendeten DNA-Proben stammten zum Teil aus den Beständen der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, zum Teil wurde sie im Rahmen dieser Arbeit mittels Aussalzmethode oder DNA-Isolierungskit Nucleospin® Blood XL (Macherey & Nagel) neu isoliert (siehe Kap. 4.2.1). Die verwendeten Primer waren ebenfalls zuerst von Harrison et al. beschrieben worden, und wurden im Verlauf analog als HLA-G1 und HLA-G2 bezeichnet. Sie binden jeweils vor und nach der Insertion in Exon 8, so dass zwei unterschiedlich große Amplifikate für das Insertionsallel (155 bp) und das Deletionsallel (141 bp) entstehen.

Die folgende Abbildung 10 zeigt einen Ausschnitt aus der Sequenz des *HLA-G*-Allels *G\*0103*, welches die 14-bp-Insertion enthält.

```

3961 ACACCCCGGG GGGCCTGATG TGTGTGGGTT GTTGAGGGGA ACAGTGGACA TAGCTGTGCT
4021 ATGAGGTTTC TTTGACTTGA ATGTATTGAG CATGTGATGG GCTGTTTAAA GTGTCACCCC
4081 TCACTGTGAC TGATATGAAT TTGTTTCATGA ATATTTTTCT GTAGTGTGAA ACAGCTGCCC
4141 TGTGTGGGAC TGAGTGGCAA GATTTGTTCA TGCCTCCCTT TGTGACTTCA AGAACCCTGA
4201 CTTCTCTTTG TGCAGAGACC AGCCACCCC TGTGTCCACC ATGACCCTCT TCCTCATGCT
4261 GAACTGCATT CCTTCCCCAA TCACCTTCC TGTTCCAGAA AAGGGGCTGG GATGCTCCG
4321 TCTCTGTCTC AAATTTGTGG TGCACTGAGC TATAACTTAC TTCTGTATTA AAATTAGAAT
4381 CTGAGTATAA ATTTACTTTT TCAAATTATT TCCAAGAGAG ATTGATGGGT TAATTAAGG
4441 AGAAGATTC TGAAATTGA GAGACAAAAT AAATGGAAGA CATGAGAACT TTCCACAGTA
4501 CACGTGTTTC TTGTGCTGAT TTGTTGCAGG AGAGGAGAGT AGATGGGGCT GCGCCCAGTG
4561 GGTGCTCAGG CCACCATGAA CTTTATGTGG TCACTGCTCA GCTGGGTCAT CTTTGTCTCT

```

Abbildung 10: 14-bp-Indel-Polymorphismus in Exon 8 von *HLA-G*. Abgebildet ist ein Ausschnitt aus der Sequenz des *HLA-G*-Allels G\*0103 (AY 645772), welches die 14-bp-Insertion im 3'UTR-Bereich von Exon 8 trägt. Exon 8 ist fett gedruckt. Die Insertion ist gelb unterlegt. Grün unterlegt ist der Einzelnukleotidpolymorphismus G/C (rs1049037). Die Bindungsstellen der Primer HLA-G1 und HLA-G2 sind jeweils unterstrichen.

Im Folgenden konnten die erhaltenen Amplifikate von 155 bp (Insertionsallel) bzw. 141 bp Länge (Deletionsallel) aufgrund ihrer unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten in der Agarosegelelektrophorese eindeutig von einander unterschieden werden. In Abbildung 11 ist exemplarisch das Ergebnis einer PCR-Reaktion dargestellt.

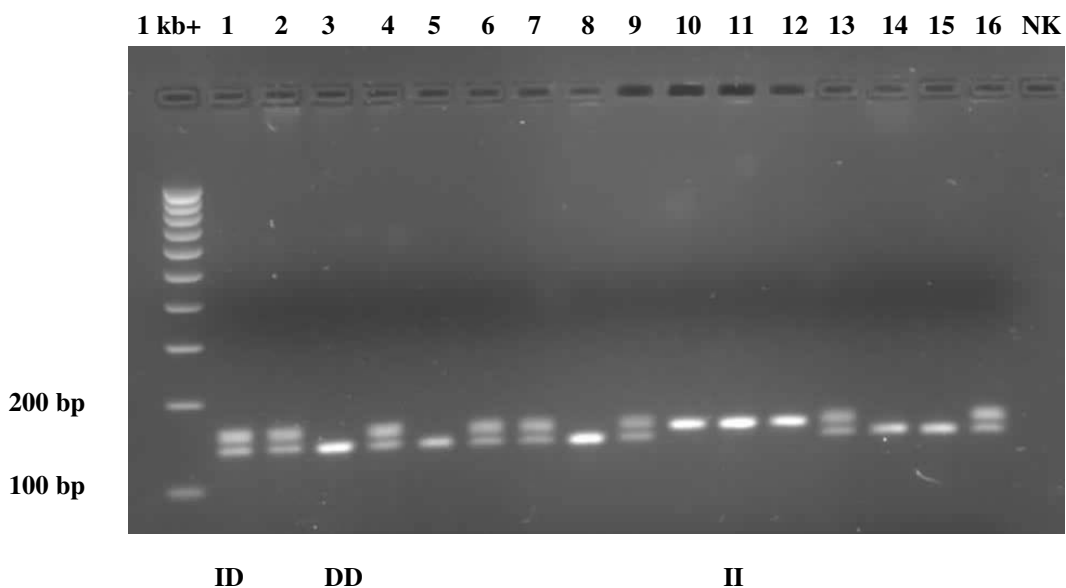


Abbildung 11: Typisierung des 14-bp-Indel-Polymorphismus. Die Abbildung zeigt 16 der untersuchten DNA-Proben. Diese wurden mit dem Primerpaar HLA-G1 und HLA-G2 amplifiziert und anschließend auf ein 2,5%iges Agarosegel aufgetragen. Jeweils ein Amplifikat, welches bezüglich des Polymorphismus homozygot für das Insertionsallel (II, Nr. 11), homozygot für das Deletionsallel (DD, Nr. 3) oder heterozygot (ID, Nr. 1) ist, wurde beispielhaft beschriftet. Die Größen für zwei Banden des Längenstandards 1 kb+ sind ebenfalls angegeben. NK bezeichnet die Negativkontrolle. Die DNA-Proben stammen in aufsteigender Reihenfolge von den im Anhang tabellarisch aufgeführten Kontrollindividuen 28, 29, 30, 39, 41, 42, 49, 51, 53, 55, 56, 63, 68, 69, 73, 74.

Amplifikate, die das Insertionsallel enthalten, sind mit 155 bp länger als Amplifikate von 141 bp die das Deletionsallel besitzen. Deshalb wandern diese etwas langsamer als die kleineren Amplifikate mit zwei Deletionsallelen durch das 2,5%ige Agarosegel. Auch die heterozygoten Proben sind anhand ihrer charakteristischen Doppelbande eindeutig zu identifizieren. Die genauen PCR-Bedingungen sind in Kapitel 4.2.3 angegeben. Die Ergebnisse der Typisierung hinsichtlich des Vorkommens des 14-bp-Indel-Polymorphismus sind in den folgenden Tabellen aufgeführt. In Tabelle 7 ist die Frequenz von Insertions- und Deletionsallel bei den verschiedenen Kollektiven dargestellt.

	<b>PG-Patientinnen</b> <b>n=18 (%)</b>	<b>Väter</b> <b>n=12 (%)</b>	<b>Kinder</b> <b>n=7 (%)</b>	<b>Kontrollgruppe</b> <b>n=44 (%)</b>
<b>Del</b>	15 (42)	17 (71)	7 (50)	46 (52)
<b>Ins</b>	21 (58)	7 (29)	7 (50)	42 (48)

Tabelle 7: Allelfrequenzen für das Deletionsallel (Del) und das Insertionsallel (Ins) des 14-bp-Indel-Polymorphismus in Exon 8 von *HLA-G* bei PG-Patientinnen, Vätern, Kindern und Kontrollindividuen. Da jeweils zwei *HLA-G*-Allele exprimiert werden, sind die Fallzahlen verdoppelt.

Die Frequenz des Insertionsallels in der kaukasischen Bevölkerung wird in der Literatur unterschiedlich angegeben. Hviid (2006) gibt die Frequenz des Insertionsallels in der kaukasischen Bevölkerung mit 45% an. Glas et al. (2007) ermittelten für das Insertionsallel in einem 739 Kaukasier umfassenden Kontrollkollektiv eine Frequenz von 39% und in der NCBI-Gendatenbank wird für ein Kollektiv von 200 Europäern eine Frequenz von 32% für das Insertionsallel angegeben (NCBI 2008). Im Kollektiv der Pemphigoid-gestationis-Patientinnen betrug die Frequenz für das Insertionsallel 58%, im Kollektiv der Partner 29% und im Kollektiv der Kinder 50%. Im Kontrollkollektiv betrug sie 48%.

In Tabelle 8 ist dargestellt, wie viele Proben bezüglich des 14-bp-Indel-Polymorphismus homozygot für das Insertionsallel, homozygot für das Deletionsallel oder heterozygot waren.

	<b>PG-Patientinnen</b> n=18 (%)	<b>Väter</b> n=12 (%)	<b>Kinder</b> n=7 (%)	<b>Kontrollgruppe</b> n=44 (%)
<b>Del/Del</b>	4 (22)	6 (50)	1 (14)	13 (30)
<b>Del/Ins</b>	7 (39)	5 (42)	5 (72)	20 (45)
<b>Ins/Ins</b>	7 (39)	1 (8)	1 (14)	11 (25)

Tabelle 8: Genotypfrequenzen des 14-bp-Indel-Polymorphismus in Exon 8 von *HLA-G* bei PG-Patientinnen, Vätern, Kindern und Kontrollindividuen. Für das Deletionsallel homozygote Individuen werden mit Del/Del, für das Insertionsallel homozygote Individuen mit Ins/Ins und heterozygote Individuen mit Del/Ins bezeichnet.

Die Frequenz der Individuen, die für das seltener vorkommende Insertionsallel homozygot waren, betrug im Kollektiv der Pemphigoid-gestationis-Patientinnen 39%. Im Kollektiv der Väter betrug die Frequenz 8%, im Kollektiv der Kinder 14% und im Kontrollkollektiv 25%. In dem 739 Kontrollindividuen umfassenden Kollektiv, das von Glas et al. (2007) untersucht wurde, betrug die Frequenz für Individuen, die bezüglich des Insertionsallels homozygot waren 14%. Um zu überprüfen, ob ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Allelträger des Insertionsallels oder des Deletionsallels besteht, wurde zusätzlich die Häufigkeit der beiden möglichen Phänotypen in den jeweiligen Kollektiven ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

	<b>PG-Patientinnen</b> n=18 (%)	<b>Väter</b> n=12 (%)	<b>Kinder</b> N=7 (%)	<b>Kontrollgruppe</b> n=44 (%)
<b>Deletionsphänotyp</b> Del/Del + Del/Ins	4+7=11 (61,1)	6+5=11 (91,7)	1+5=6 (85,7)	13+20=33 (75,0)
<b>Insertionsphänotyp</b> Ins/Ins + Del/Ins	7+7=14 (77,8)	1+5=6 (50,0)	1+5=6 (85,7)	11+20=31 (70,5)

Tabelle 9: Phänotypfrequenzen des 14-bp-Indel-Polymorphismus in Exon 8 von *HLA-G* bei PG-Patientinnen, Vätern, Kindern und Kontrollindividuen. Mit Deletionsphänotyp sind Allelträger des



Deletionsallels (Del/Del + Del/Ins), mit Insertionsphänotyp Allelträger des Insertionsallels (Ins/Ins + Del/Ins) bezeichnet.

Um einen möglichen Einfluss des 14-bp-Indel-Polymorphismus auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit für Pemphigoid gestationis nachzuweisen, wurde ein statistischer Vergleich der Allel-, Genotyp- und Phänotypfrequenzen der verschiedenen Kollektive vorgenommen. Dieser erfolgte mittels des Exakten Tests nach Fisher (Kapitel 4.3.1). Nach der statistischen Auswertung ergaben sich für die Kollektive der Pemphigoid-gestationis-Patientinnen ( $p=0,33$ ), der Väter ( $p=0,16$ ) und der Kinder ( $p=1,00$ ) keine statistisch signifikanten Abweichungen der Allelverteilungen im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Auch ein Vergleich von Genotypfrequenzen (PG-Patientinnen:  $p=0,36$ ; Väter:  $p=0,43$ ; Kinder:  $p=1,00$ ) und Phänotypfrequenzen (PG-Patientinnen:  $p=0,64$ ; Väter:  $p=0,42$ ; Kinder:  $p=1,00$ ) mit dem Kontrollkollektiv zeigte keine statistisch signifikante Assoziation zum Pemphigoid gestationis.

Es fiel allerdings eine relative Häufung des Insertionsallels im Kollektiv der Pemphigoid-gestationis-Patientinnen auf. Dieses war mit einer Frequenz von 58% einzig im Pemphigoid-gestationis-Kollektiv das häufiger vorkommende Allel. Mögliche Erklärungsansätze hierfür werden in Kapitel 6 diskutiert.

## **5.2 Typisierung ausgewählter Einzelnukleotidpolymorphismen im *HLA-G*-Promotor**

Einzelnukleotidpolymorphismen in der Promotorregion von *HLA-G* wurden erstmals von Hviid et al. (1999) beschrieben. Ober et al. (2003) fanden in einer Population von Hutteriten, einer christlichen Sekte europäischer Herkunft, 18 SNP in der betreffenden Region. In einer Folgestudie an verschiedenen Populationen konnten Tan et al. (2005) schließlich 27 SNP identifizieren, die zusammen 13 verschiedene Promotorhaplotypen bilden. Für diese Arbeit wurden vier der bei Ober et al. (2003) beschriebenen SNP zur Untersuchung ausgewählt. Gemein sind ihnen ihre Lage innerhalb oder in der Nähe funktioneller Elemente, und/oder eine bereits bekannte klinische Assoziation.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsrisiko für Pemphigoid gestationis und dem Vorkommen der ausgewählten Einzelnukleotidpolymorphismen zu untersuchen, wurden die DNA-Proben von Patientinnen, Vätern, Kindern und Kontrollindividuen diesbezüglich typisiert und die Ergebnisse statistisch ausgewertet. Wenn in der SNP-Datenbank des National Center for Biotechnology Information

(NCBI) Daten zu Allel- und Genotypfrequenzen der untersuchten Polymorphismen erfasst waren, wurden diese z. T. ebenfalls tabellarisch dargestellt und in die Diskussion der Ergebnisse miteinbezogen.

Untersucht wurden die SNP an den Positionen -1306 (rs1736936), -964 (rs1632947), -762 (rs1632946) und -725 (rs1233334). Alle Primer und Restriktionsenzyme sowie die genauen Reaktionsbedingungen für die PCR und die RFLP-Analysen sind in den Kapiteln 4.2.3 und 4.2.4 angegeben. Die Abbildung 12 zeigt einen Ausschnitt aus der Sequenz der 5'-flankierenden Region des *HLA-G*-Gens:

```

-1432 CACAAGAATG AGGTGGAGCC ACTGGAGTGT TTTAGGTGGA GAAATGACAC ACTCTGACTC
-1372 ATAGTAGCAG GACCACTATA GAGAGAACAC TCATGTAGCA GGTCAATGGAA CAGTGCTAGA
-1312 GCCACAATTC AGGAGTGAGA GGGTGGTGGG GATTAAGGGG AGAAGAGGGC CTGAGGGATG
-1252 AGAGGGACGG AGGGAAGGGG CTGGAGGAGC AGGAGGTGAG GAAAAGGAGC AGAGGAAAGA
-1192 ATTCCAAAGC AGCGAAGCTC TTAGGTTTAA ACACATTGTT TTATAGATTT TAATTCATCC
-1132 ATCTACAGAG CCTCGCTGGG TGTTCTTTGC AGTTGGCCTT TAATATCTTA TGTGGGTCTG
-1072 CCTAGAAACT AATTGTTTTT TATGTTAATC AGGTTTAAAA AATACTAAGT ATTCCATAAA
-1012 AATATACACT CCACTCACAT GTGGATACTT CTTAAAAACA GGCAGTGGT GAGCACTAGT
-952 GAGGGGCATT GTGACTGCAC TGAACACTTA CAACTGTGAG GTGAATAAAG TTTGTGCTGG
-892 CTCCTGGTTG CAACATATAG TAACATAGTG TGGTACTTTG TCTTGAGGAG ATGCTCTGGA
-832 CTCACACGGA AACTTAGGGC TAGGGAATGA AGGTAATTT AAAATAAAC AAGCGGAGT
-772 CACAGATACA CTGTCTGGGA AAGTGAACCT TAAGAGCTTT GTGAGTCTG TTGTAAAGCT
-712 TTTAGATGCA TTTATATACC AACAGGCCAA AGTCACATTT TTTACCATT AGATTCTCGA
-652 TCATTCAGGG GTTACCAAGG TTATGTACC CACTATAGTT AATAAACAAA AAGCAAACCTG
-592 GTCTCTATTC TATCTCATGC ACTCAGGCAC AACTTTTCCA GATTTAAGGG GGAAAAAATA
-532 CCCTGTCTTT ACACCTACAA TCCAGGGCG AGCTCACTCT CTGGCAACA GCTCCGTGGG
-472 GTGATTTTTC TTCTAGAAGA GTACAGGAGG ACAGGCAAGG AGTGGGAGG AGGGAGTCCA
-412 GTTCAGGGAC AGGATTCCG GCATGAAAAG TGAAGGAGA GGGCAGGGA CCTTGCCGAG
-352 GGTTCCTCCC TGTTTCTCA GACAGCTCCT GGGCCAAGAC TCAGGGAGAC ACTGAGACAG
-292 AACGCTTGGC ACAAGAGTAG CGGGGTCAGG GCGAAGTCCC AGGGCCTCAA GCGTGGCTCT
-232 CAGGTTCTCA GGCCCCACAG GCGGTGTATG GGTGGGAG GCCCCGCTT GGGGATTCTC
-172 TCCTCTCTCT CCTAACCTGT GTCGGGTCTT TCTTCTGGA TACTCACCGG GCGGCCCCAG
-112 TTCTCACTCC CATTAGGTGA CAGGTTTTTA GAGAAGCCAA TCAGCGTCGC CGCGTCTG
-52 GTTCTAAGT CCTCGCTCAC CCACCCGGAC TCATTCTCCC CAGACGCCAA GGATGGTGGT
9 CATGGCCCC CGAACCTCT TCCTGCTCT CTCGGGGGCC CTGACCCTGA CCGAGACCTG
69 GCGGGGTGAG TGCGGGGTCA GGAGGAAAC AGCCCTGCG CGGAGGAGG AGGGCCGC
129 CCGGCGGGG CGCAGGACTC GGCAGCCGCG CCGGGAGGAG GGTGCGGCGG GTCTCAACC
189 CTCCTCGCCC CCAGGCTCCC ACTCCATGAG GTATTTCAGC GCCGCCGTGT CCCGCCCGG
249 CCGCGGGGAG CCCCCTTCA TCGCCATGGG CTACGTGGAC GACCGCAGT TCGTGCAGTT
309 CGACAGCGAC TCGGCTGTC CGAGGATGGA GCCCGGGCG CCGTGGGTGG AGCGGAGGG
351 GCCGAGTAT TGGGAAGAGG AGACACGGAA CACCAAGGCC CA

```

Abbildung 12: Sequenz der 5'-flankierenden Region von *HLA-G*. Dargestellt ist die Sequenz eines ca. 1,8 kb großen Abschnitts der 5'-flankierenden Region von *HLA-G* sowie Exon 1 und Intron 1. Gelb unterlegt und fett gedruckt sind alle Einzelnukleotidpolymorphismen, die für diese Arbeit untersucht wurden. Grün unterlegt sind alle anderen bekannten Einzelnukleotidpolymorphismen. Die Regulationselemente CRE (violett), GAS (orange), ISRE (hellblau), Enhancer A (rot), CCAAT und TATA-Box (blau) sind eingezeichnet. Grau unterlegt ist ein Progesteron-response-Element (PRE). Die Lage der funktionellen Elemente wurde nach Gobin et al. (2002) und Yie et al. (2006b) eingezeichnet. Exon 1 ist fett gedruckt, das Startcodon ATG ist zusätzlich unterstrichen. Die Positionen sind relativ zum Translationsstart (+1) angegeben.

Die SNP an den Positionen -1306, -964, -762, -716, -689, -666, -633, -486, -201 und +15 befinden sich nach den von Tan et al. (2005) erhobenen Daten in einem vollständigen Kopplungsungleichgewicht (Tan et al. 2005). Für die im Rahmen dieser

Arbeit untersuchten SNP-Positionen -1306, -964 und -762 wären demnach nur die Kombination G-G-C oder A-A-T vorausgesagt. Das Kopplungsungleichgewicht der untersuchten Positionen konnte weitgehend bestätigt werden. Ausnahmen konnten lediglich im Kollektiv der Pemphigoid-gestationis-Patientinnen beobachtet werden. In drei Fällen war in diesem Kollektiv das Kopplungsungleichgewicht an den untersuchten Positionen aufgehoben (siehe Kap. 9.1). Ob es sich hierbei tatsächlich um einen neuen Promotorhaplotyp mit der Allelkombination G-A-T handelt, konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht durch weitergehende Untersuchung der betreffenden DNA-Proben geklärt werden. Allerdings beschreiben Ober et al. (2003) einen Promotorhaplotyp mit der Allelkombination A-A-C an den betreffenden Positionen, welcher bislang nur in deren Hutteritenkollektiv auftrat. Widersprüchliche Daten bezüglich des Kopplungsgleichgewichtes sind in der SNP-Datenbank des NCBI zu finden. Die Allelverteilung ist dort für 92 Individuen des Centre d'Etude du Polymorphisme Human(CEPH)-Kollektivs angegeben. Während die Allelverteilung für die SNP-Positionen -1306 (G: 45%, A: 55%) und -964 (G: 49%, A: 51%) derjenigen des Kontrollkollektivs sehr ähnlich ist, weicht die Allelfrequenz für die Position -762 (C: 23%, T: 77%) deutlich davon ab. Weitere Recherchen in der Hapmap-Datenbank ([http://www.hapmap.org/cgi-perl/gbrowse/hapmap\\_B36/](http://www.hapmap.org/cgi-perl/gbrowse/hapmap_B36/) Stand: 26.12.2008) ergaben, dass bislang noch keine weitere Testung bezüglich eines Kopplungsungleichgewichts der betreffenden SNP vorgenommen wurde, so dass die Ergebnisse der Testung der Kontrollgruppe als maßgeblich für die statistische Auswertung angenommen wurden.

### 5.2.1 Der Einzelnukleotidpolymorphismus -1306 (rs1736936)

Der Einzelnukleotidpolymorphismus -1306 A/G wurde erstmals von Hviid et al. (1999) beschrieben. Er liegt innerhalb eines möglicherweise als Locus-Kontrollregion für *HLA-G* fungierenden Bereiches, der sich zwischen 1,1 und 1,4 kb distal des Translationsstarts erstreckt (Moreau et al. 1997).

```

-1432 CACAAGAATG AGGTGGAGCC ACTGGAGTGT TTTAGGTGGA GAAATGACAC ACTCTGACTC
-1372 ATAGTAGCAG GACCACTATA GAGAGAACAC TCATGTAGCA GGTCAITGGAA CAGTGTCTAGA
-1312 GGCACAGTTC AGGAGTGAGA GGGTGGTGGG GATTAAGGGG AGAAGAGGGC CTGAGGGATG
-1252 AGAGGGACGG AGGGAAGGGG CTGGAGGAGC AGGAGGTGAG GAAAAGGAGC AGAGGAAAGA
-1192 ATTCCAAAGC AGCGAAGACTC TTAGGTTTAA ACACATTGTT TTATAGATTT TAATACATCC

```

Abbildung 13: Sequenzausschnitt der 5'-flankierenden Region von *HLA-G*. Der Einzelnukleotidpolymorphismus A/G an Position -1306 relativ zum Transkriptionsstart ist gelb unterlegt.

Grün unterlegt sind weitere Einzelnukleotidpolymorphismen. Das Regulationselement CRE ist violett eingezeichnet. Die Bindungsstellen der Primer HLAG1306F2 und HLAG1306R sind jeweils unterstrichen. Rosa unterlegt sind zwei Basen die von der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Pst* I abweichen.

Für den Nachweis des Polymorphismus -1306 A/G wurden zunächst mittels PCR Amplifikate von 137 bp Länge hergestellt. Durch Änderung zweier Nukleotide im 5'-Primer wurde eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Pst* I eingefügt (siehe Kap.3.3.2). Die *Pst* I-Erkennungssequenz (5' CTGCA**G**) war im Falle des Vorliegens des G-Allels vorhanden, im Falle des Vorliegens des A-Allels jedoch nicht. Im anschließend durchgeführten Restriktionsverdau mit *Pst* I entstanden bei Vorliegen des G-Allels zwei Fragmente (109 bp + 28 bp), während bei Vorliegen des A-Allels das 137 bp lange PCR-Produkt ungeschnitten blieb. Die Fragmente wurden schließlich elektrophoretisch in einem 3%igen Agarosegel aufgetrennt und anhand des Bandenmusters genotypisiert.

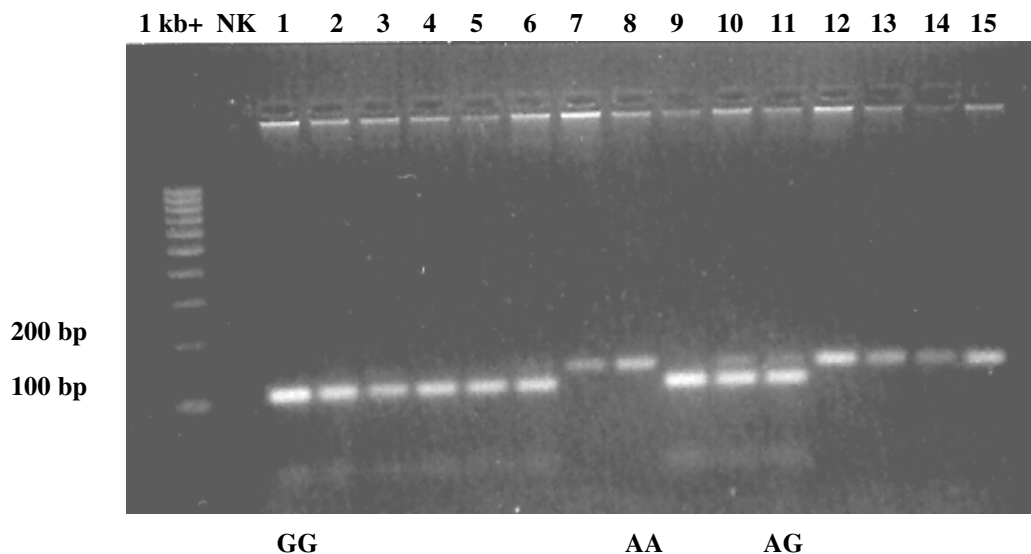


Abbildung 14: Typisierung des Einzelnukleotidpolymorphismus -1306. Die Abbildung zeigt 15 der untersuchten DNA-Proben. Die DNA-Proben wurden mit dem Primerpaar HLAG1306F2 und HLAG1306R amplifiziert, das Amplifikat anschließend mit dem Restriktionsenzym *Pst* I verdaut und in einem 3%igen Agarosegel aufgetrennt. Die obere Bande erscheint dabei schwächer, da das A-Allel trotz Optimierung der PCR-Bedingungen schwächer amplifiziert wird. Jeweils ein Amplifikat, welches bezüglich des Polymorphismus homozygot für das A-Allel (AA, Nr. 8), homozygot für das G-Allel (GG, Nr. 1) oder heterozygot (AG, Nr. 11) ist, wurde beispielhaft beschriftet. Die Größen für zwei Banden des Längenstandards 1 kb+ sind ebenfalls angegeben. NK bezeichnet die Negativkontrolle. Die DNA-Proben stammen in aufsteigender Reihenfolge von den im Anhang tabellarisch aufgeführten Kontrollindividuen 1, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 17, 20, 21, 23, 25.

In der SNP-Datenbank des NCBI sind für den Polymorphismus -1306 A/G Allel- und Genotypfrequenzen angegeben, die an einem 92 Kaukasier umfassenden Kollektiv

(CEPH) ermittelt wurden. Diese Daten sind neben den Ergebnissen der Typisierung der untersuchten Kollektive ebenfalls in den folgenden Tabellen dargestellt.

	<b>PG-Patientinnen</b> <b>n=18 (%)</b>	<b>Väter</b> <b>n=13 (%)</b>	<b>Kinder</b> <b>n=7 (%)</b>	<b>Kontrollgruppe</b> <b>n=52 (%)</b>	<b>CEPH</b> <b>n=92 (%)</b>
<b>-1306A</b>	17 (47)	9 (35)	6 (43)	59 (57)	101 (55)
<b>-1306G</b>	19 (53)	17 (65)	8 (57)	45 (43)	83 (45)

Tabelle 10: Allelfrequenzen für den SNP -1306 A/G in der 5'-regulatorischen Region von *HLA-G* bei PG-Patientinnen, Vätern, Kindern, Kontrollindividuen und dem CEPH-Kollektiv aus der SNP-Datenbank des NCBI. Da jeweils zwei *HLA-G*-Allele exprimiert werden, sind die Fallzahlen verdoppelt.

Selteneres Allel in CEPH- und Kontrollkollektiv ist jeweils das G-Allel (45% bzw. 43%). Davon abweichend stellte das G-Allel in der Gruppe der PG-Patientinnen (53%), der Väter (65%) und der Kinder (57%) das häufigere Allel dar. Ein statistischer Vergleich der untersuchten Kollektive mittels des Exakten Tests nach Fisher zeigte im Kollektiv der Väter eine tendenziell höhere Allelfrequenz für das G-Allel ( $p=0,05$ ). In den Kollektiven der PG-Patientinnen und Kinder waren keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Allelfrequenz im Vergleich zur Kontrollgruppe vorhanden (PG-Patientinnen:  $p=0,34$ ; Kinder:  $p=0,40$ ). Obwohl die relative Häufung des -1306G-Allels im Väterkollektiv auf die geringe Größe des untersuchten Kollektivs zurückzuführen sein könnte, bei der auch kleinere Unterschiede zu größeren Schwankungen der Prozentanteile führen können, wäre auch eine mögliche Bedeutung für die Auslösung eines Pemphigoid gestationis bei der Mutter zu erwägen. Eine Untersuchung an einem größeren Kollektiv könnte darüber Aufschluss geben. Die Häufigkeiten der verschiedenen Genotypen werden in der Tabelle 11 dargestellt.

	<b>PG-Patientinnen</b> n=18 (%)	<b>Väter</b> n=13 (%)	<b>Kinder</b> n=7 (%)	<b>Kontrollgruppe</b> n=52 (%)
<b>1306AA</b>	4 (22)	2 (15)	1 (14)	17 (33)
<b>1306AG</b>	9 (50)	5 (39)	4 (57)	25 (48)
<b>1306GG</b>	5 (28)	6 (46)	2 (29)	10 (19)

Tabelle 11: Genotypfrequenzen für den SNP -1306 A/G in der 5'-regulatorischen Region von *HLA-G* bei PG-Patientinnen, Vätern, Kindern und Kontrollindividuen.

Der Vergleich der Genotypfrequenzen mit dem Kontrollkollektiv ergab erneut einen tendenziellen, wenn auch nicht statistisch signifikanten Unterschied zur Gruppe der Väter. Als positiver Risikofaktor wurde der seltenere Fall homozygot GG angenommen. Der p-Wert für den Exakten Test nach Fisher lag bei 0,07. Für die Kollektive der PG-Patientinnen und der Kinder fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Genotypfrequenzen im Vergleich zum Kontrollkollektiv (PG-Patientinnen:  $p=0,51$ ; Kinder  $p=0,62$ ). Auch ein Vergleich der Phänotypfrequenzen der verschiedenen Kollektive mit dem Kontrollkollektiv zeigte keine statistisch signifikante Assoziation zum Pemphigoid gestationis (PG-Patientinnen:  $p=0,66$ ; Väter:  $p=0,30$ ; Kinder:  $p=0,75$ ).

### 5.2.2 Der Einzelnukleotidpolymorphismus -964 (rs1632947)

Dieser SNP wurde ebenfalls von Hviid et al. (1999) erstmals beschrieben. Er rückte in den Blickpunkt des Interesses, als in einer Studie ein Zusammenhang mit der Erkrankungswahrscheinlichkeit für Asthma bronchiale hergestellt werden konnte (Nicolae et al. 2005).

```

-1072 CCTAGAAACT AATTGTTTT TATGTTAATC AGGTTTAAAA AATACTAAGT ATTCCTAAAA
-1012 AATATACACT CCACTCACAT GTGGATACTT CCTAAAAACA GGCACTGCGT GAGCACTAGT
-952 GAGGGGCATT TGACTGTCAC TGAACACTTA CAACTGTGAG GTGAATAAAG TTTGTGCTGG
-892 CTCTGGTTG CAACATATAG TAACATAGTG TGGTACTTTG TCTTGAGGAG ATGTCCTGGA

```

Abbildung 15: Sequenzausschnitt der 5'-flankierenden Region von *HLA-G*. Der Einzelnukleotidpolymorphismus A/G an Position -964 relativ zum Transkriptionsstart ist gelb unterlegt. Das Regulationselement GAS ist orange eingezeichnet, das Regulationselement CRE violett. Die Bindungsstellen der Primer HLAG964F2 und HLAG964R sind jeweils unterstrichen. Rosa unterlegt sind zwei Basen, die von der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Mlu* I abweichen.

Für den Nachweis des Polymorphismus an der Position -964 relativ zum Transkriptionsstart im *HLA-G*-Promotor wurden zunächst mittels PCR Amplifikate von 142 bp Länge hergestellt. Durch Änderung zweier Nukleotide im 5'-Primer wurde eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Mlu* I eingefügt (siehe Kap.3.3.2). Die *Mlu* I-Erkennungssequenz (5' AICGCGT) war im Falle des Vorliegens des G-Allels vorhanden, im Falle des Vorliegens des A-Allels jedoch nicht. Im anschließend durchgeführten Restriktionsverdau mit *Mlu* I entstanden bei Vorliegen des G-Allels zwei Fragmente (111 bp + 31 bp), während bei Vorliegen des A-Allels das 142 bp lange PCR-Produkt nicht geschnitten wurde. Die Fragmente wurden schließlich in einem 3%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anhand des Bandenmusters genotypisiert.

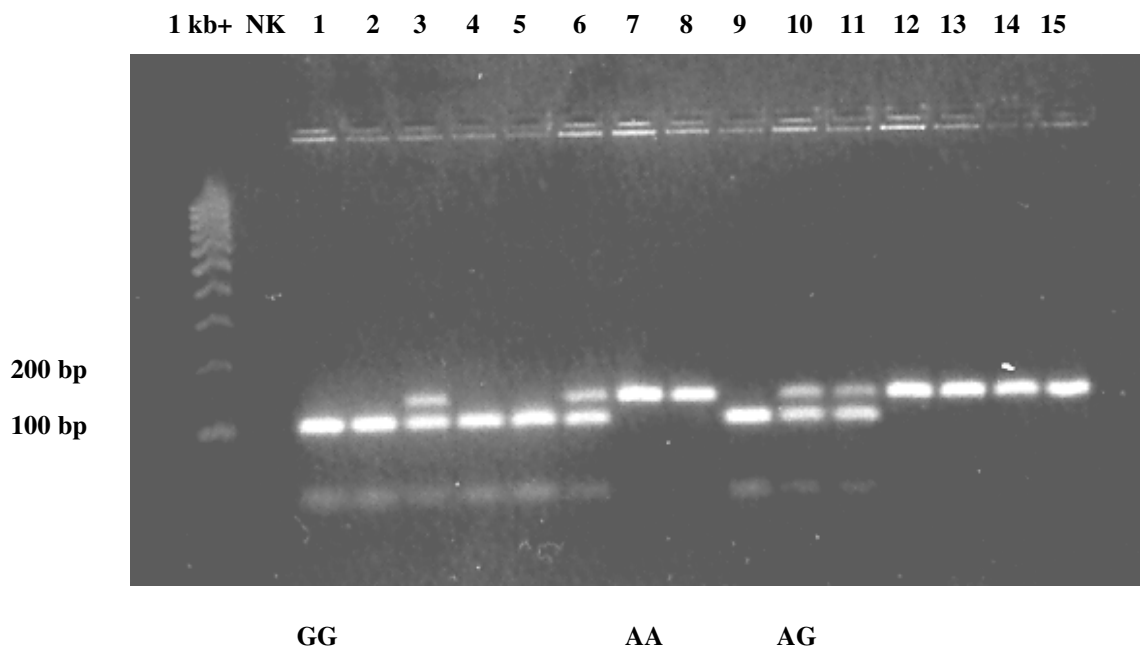


Abbildung 16: Typisierung des Einzelnukleotidpolymorphismus -964. Die Abbildung zeigt 15 der untersuchten DNA-Proben. Die DNA-Proben wurden mit dem Primerpaar HLAG964F2 und HLAG964R amplifiziert, das Amplifikat anschließend mit dem Restriktionsenzym *Mlu* I verdaut und in einem 3%igen Agarosegel aufgetrennt. Jeweils ein Amplifikat, welches bezüglich des Polymorphismus homozygot für das A-Allel (AA, Nr. 7), homozygot für das G-Allel (GG, Nr. 1) oder heterozygot (AG, Nr. 11) ist, wurde beispielhaft beschriftet. Die Größen für zwei Banden des Längenstandards 1 kb+ sind ebenfalls angegeben. NK bezeichnet die Negativkontrolle. Die DNA-Proben stammen in aufsteigender Reihenfolge von den im Anhang tabellarisch aufgeführten Kontrollindividuen 1, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 17, 20, 21, 23, 25.

Die Ergebnisse der Typisierung sind in den folgenden Tabellen dargestellt:

	<b>PG-Patientinnen</b> n=18 (%)	<b>Väter</b> n=13 (%)	<b>Kinder</b> n=7 (%)	<b>Kontrollgruppe</b> n=52 (%)	<b>CEPH</b> n= 92 (%)
<b>-964A</b>	20 (56)	9 (35)	6 (43)	59 (57)	94 (51)
<b>-964G</b>	16 (44)	17 (65)	8 (57)	45 (43)	90 (49)

Tabelle 12: Allelfrequenzen für den SNP -964 A/G in der 5'-regulatorischen Region von *HLA-G* bei PG-Patientinnen, Vätern, Kindern, Kontrollindividuen und dem CEPH-Kollektiv aus der SNP-Datenbank des NCBI. Da jeweils zwei *HLA-G*-Allele exprimiert werden, sind die Fallzahlen verdoppelt.

	<b>PG-Patientinnen</b> N=18 (%)	<b>Väter</b> n=13 (%)	<b>Kinder</b> n=7 (%)	<b>Kontrollgruppe</b> n=52 (%)
<b>-964AA</b>	5 (28)	2 (15)	1 (14)	17 (33)
<b>-964AG</b>	10 (55)	5 (39)	4 (57)	25 (48)
<b>-964GG</b>	3 (17)	6 (46)	2 (29)	10 (19)

Tabelle 13: Genotypfrequenzen für den SNP -964 A/G in der 5'-regulatorischen Region von *HLA-G* bei PG-Patientinnen, Vätern, Kindern und Kontrollindividuen.

Das -964G-Allel stellt das seltenere Allel in CEPH- und Kontrollkollektiv (49% bzw. 43%) sowie bei den PG-Patientinnen (44%) dar. Im Kollektiv der Väter (65%) und der Kinder (57%) war dagegen das A-Allel häufiger vertreten. Ein statistischer Vergleich der untersuchten Kollektive mittels des Exakten Tests nach Fisher zeigte im Kollektiv der Partner wiederum eine tendenziell höhere Allelfrequenz für das G-Allel ( $p=0,05$ ) und den Fall Genotyp GG ( $p=0,07$ ). In den Kollektiven der PG-Patientinnen und Kinder konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Allel- oder Genotypfrequenzen im Vergleich mit der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Ein Vergleich der Phänotypfrequenzen der verschiedenen Kollektive mit dem Kontrollkollektiv zeigte keine statistisch signifikante Assoziation zum Pemphigoid gestationis.

### 5.2.3 Der Einzelnukleotidpolymorphismus -762 (rs1632946)

Der Einzelnukleotidpolymorphismus -762 C/T wurde erstmals von Ober et al. (2003) in der Hutteritenpopulation beschrieben. Wie in der Abbildung 17 verdeutlicht, liegt er in



der Nähe der funktionellen Elemente cAMP-response element (CRE) und interferon-specific regulatory element (ISRE) im *HLA-G*-Promotor.

```

-892 CTCCTGGTTG CAACATATAG TAACATAGTG TGGTACTTTG TCTTGAGGAG ATGTCCTGGA
-832 CTCACACGGA AACTTAGGGC TAGGAATGA AGGTAAATTT AAAATAAAAAC AAGCGGGAGT
-772 CACAGATACA CTGTTGGGA AAGTGAACT TAAGAGCTTT GTGAGTCCTG TTGTAAGCT
-712 TTTAGATGCA TTTATATACC AACGGCCAA AGTCACATTT TTTACCGATT AGATTCCTGA
-652 TCATTCGGG GTTACCAAGG TTATGCTACC CACTATAGTT AATAAACAAA AAGCAAACTG

```

Abbildung 17: Sequenzausschnitt der 5'-flankierenden Region von *HLA-G*. Der Einzelnukleotidpolymorphismus C/T an Position -762 sowie der Einzelnukleotidpolymorphismus C/G/T an Position -725 relativ zum Translationsstart sind gelb unterlegt. Grün unterlegt sind alle anderen bekannten Einzelnukleotidpolymorphismen. Das Regulationselement CRE ist in violett eingezeichnet, das Regulationselement ISRE hellblau. Die Bindungsstellen der Primer HLAG762F und HLAG762R sind jeweils unterstrichen. Rosa unterlegt ist die Base, die von der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Dra* III abweicht.

Für den Nachweis des Polymorphismus C/T an der Position -762 relativ zum Transkriptionsstart wurden zunächst mittels PCR Amplifikate von 144 bp Länge hergestellt. Durch Änderung eines Nukleotids im 3'-Primer konnte eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Dra* III eingefügt werden (siehe Kap.3.3.2). Die *Dra* III-Erkennungssequenz (5' CACCNNNIGTG) war im Falle des Vorliegens des C-Allels vorhanden, im Falle des Vorliegens des T-Allels jedoch nicht. Im anschließend durchgeführten Restriktionsverdau mit *Dra* III entstanden bei Vorliegen des C-Allels zwei Fragmente (111 bp + 33 bp), während bei Vorliegen des T-Allels das 144 bp lange PCR-Produkt ungeschnitten blieb. Die Fragmente wurden schließlich auf einem 3 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anhand des Bandenmusters genotypisiert.

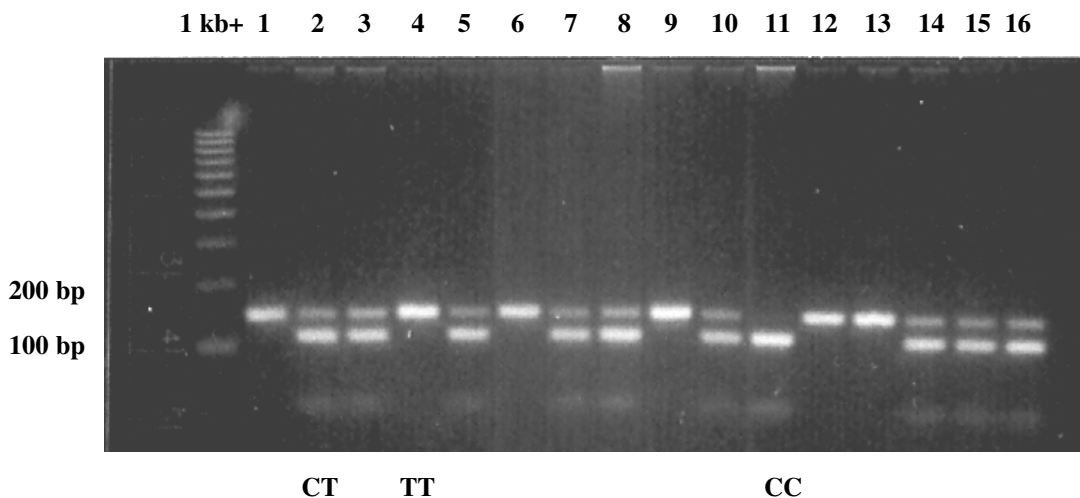


Abbildung 18: Typisierung des Einzelnukleotidpolymorphismus -762. Die Abbildung zeigt 16 der untersuchten DNA-Proben. Die DNA-Proben wurden mit dem Primerpaar HLAG762F und HLAG762R amplifiziert, das Amplifikat anschließend mit dem Restriktionsenzym *Dra* III verdaut und in einem

3%igen Agarosegel aufgetrennt. Jeweils ein Amplifikat, welches bezüglich des Polymorphismus homozygot für das C-Allel (CC, Nr. 11), homozygot für das T-Allel (TT, Nr. 4) oder heterozygot (CT, Nr. 2) ist, wurde beispielhaft beschriftet. Die Größen für zwei Banden des Längenstandards 1 kb+ sind ebenfalls angegeben. Die DNA-Proben stammen in aufsteigender Reihenfolge von den im Anhang tabellarisch aufgeführten Kontrollindividuen 74, 75, 77, 78, 80, 82, 90, 97, 103, 104, 105, 106, 114, 120, 125, 126.

	<b>PG-Patientinnen</b> n=17 (%)	<b>Väter</b> n=13 (%)	<b>Kinder</b> n=7 (%)	<b>Kontrollgruppe</b> n=52 (%)	<b>CEPH</b> n=92 (%)
<b>-762T</b>	19 (56)	9 (35)	6 (43)	59 (57)	142 (77)
<b>-762C</b>	15 (44)	17 (65)	8 (57)	45 (43)	42 (23)

Tabelle 14: Allelfrequenzen für den SNP -762 T/C in der 5'-regulatorischen Region von *HLA-G* bei PG-Patientinnen, Vätern, Kindern, Kontrollindividuen und dem CEPH-Kollektiv aus der SNP-Datenbank des NCBI. Da jeweils zwei *HLA-G*-Allele exprimiert werden, sind die Fallzahlen verdoppelt.

	<b>PG-Patientinnen</b> n=17 (%)	<b>Väter</b> n=13 (%)	<b>Kinder</b> n=7 (%)	<b>Kontrollgruppe</b> n=52 (%)
<b>-762TT</b>	5 (29)	2 (15)	1 (14)	17 (33)
<b>-762TC</b>	9 (53)	5 (39)	4 (57)	25 (48)
<b>-762CC</b>	3 (18)	6 (46)	2 (29)	10 (19)

Tabelle 15: Genotypfrequenzen für den SNP -762 T/C in der 5'-regulatorischen Region von *HLA-G* bei PG-Patientinnen, Vätern, Kindern und Kontrollindividuen.

Beim Vergleich der verschiedenen Kollektive mit der Kontrollgruppe mittels des Exakten Tests nach Fisher ergaben sich p-Werte kleiner 0,1 für die Fälle „Vater besitzt ein C-Allel“ ( $p=0,05$ ) und „Vater homozygot für das C-Allel“ ( $p=0,07$ ). Beim Vergleich der Kollektive der PG-Patientinnen und Kinder mit dem Kontrollkollektiv zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Ein Vergleich der Phänotypfrequenzen der verschiedenen Kollektive mit dem Kontrollkollektiv zeigte ebenfalls keine statistisch signifikante Assoziation zum Pemphigoid gestationis.

### 5.2.4 Der Einzelnukleotidpolymorphismus -725 (rs1233334)

Der triallelische SNP -725 C/G/T wurde ebenfalls von Ober et al. (2003) in der Hutteritenpopulation beschrieben. Diese Arbeitsgruppe konnte auch nachweisen, dass das -725G Allel ein CpG-Dinukleotid bildet und eine Methylierung des Cytosins an der Position -726 zur Folge hat. Auch eine klinische Korrelation mit einer erhöhten Spontanabortrate in der Hutteritenpopulation, sofern beide Eltern das G-Allel besitzen, konnte nachgewiesen werden. In einer Folgestudie konnten Ober et al. (2006) schließlich zeigen, dass das Vorliegen des -725G Allels tatsächlich einen Einfluss auf die Expressionsstärke des *HLA-G*-Gens hat.

```
-832 CTCACACGGA AACTTAGGGC TA GGAATGA AGGTAAATTT AAAATAAAAC AAGCGGGAGT
-772 CACAGATACA CTGTCGGGA AAGTGA AACT TAAGAGCTTT GTGAGTCCTG TTGTAA GCT
-712 TTTAGATGCA TTTATATACC AACGGCCAA AGTCACATTT TTTACCGATT AGATTCCTGA
-652 TCATTCGGG GTTACCAAGG TTATGCTACC CACTATAGTT AATAAACAAA AAGCAAAC TG
```

Abbildung 19: Sequenzausschnitt der 5'-flankierenden Region von *HLA-G*. Der Einzelnukleotidpolymorphismus C/T an Position -762 sowie der Einzelnukleotidpolymorphismus C/G/T an Position -725 relativ zum Transkriptionsstart sind gelb unterlegt. Grün unterlegt sind alle anderen bekannten Einzelnukleotidpolymorphismen. Das Regulationselement CRE ist violett eingezeichnet, das Regulationselement ISRE hellblau. Die Bindungsstellen der Primer HLAG725F2 und HLAG725R sind jeweils unterstrichen. Rosa unterlegt ist die Base, die von der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Stu* I abweicht.

Für den Nachweis des C-Allels des triallelischen SNP -725 C/G/T im *HLA-G*-Promotor wurde zunächst mittels PCR ein Amplifikat von 127 bp Länge hergestellt. Durch Änderung eines Nukleotids im 5'-Primer wurde eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Stu* I eingefügt (siehe Kap.3.3.2). Diese Erkennungssequenz (5' AGGICCT) war im Falle des Vorliegens des C-Allels vorhanden, im Falle des Vorliegens des G oder T-Allels jedoch nicht. Im anschließend durchgeführten Restriktionsverdau mit *Stu* I entstanden bei Vorliegen des C-Allels zwei Fragmente (93 bp + 34 bp), während bei Vorliegen des G- oder T-Allels das 127 bp lange PCR-Produkt nicht geschnitten wurde. Die Fragmente wurden schließlich in einem 3%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anhand des Bandenmusters genotypisiert. Anschließend wurde zur Differenzierung zwischen dem T- und dem G-Allel ein weiterer Restriktionsverdau mit *Hyp*CH4 IV durchgeführt.

```
-832 CTCACACGGA AACTTAGGGC TA GGAATGA AGGTAAATTT AAAATAAAAC AAGCGGGAGT
-772 CACAGATACA CTGTCGGGA AAGTGA AACT TAAGAGCTTT GTGAGTCCTG TTGTAA GCT
-712 TTTAGATGCA TTTATATACC AACGGCCAA AGTCACATTT TTTACCGATT AGATTCCTGA
-652 TCATTCGGG GTTACCAAGG TTATGCTACC CACTATAGTT AATAAACAAA AAGCAAAC TG
```

Abbildung 20: Sequenzausschnitt der 5'-flankierenden Region von *HLA-G*. Der Einzelnukleotidpolymorphismus C/T an Position -762 sowie der Einzelnukleotidpolymorphismus C/G/T an Position -725 relativ zum Transkriptionsstart sind gelb unterlegt. Grün unterlegt sind alle anderen bekannten Einzelnukleotidpolymorphismen. Das Regulationselement CRE ist violett eingezeichnet, das Regulationselement ISRE hellblau. Die Bindungsstellen der Primer HLAG725F3 und HLAG725R sind jeweils unterstrichen. Rosa unterlegt ist die Base, die von der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Hyp*CH4 IV abweicht.

Hierfür wurde zunächst mittels PCR ein Amplifikat von 127 bp Länge hergestellt. Durch Änderung eines Nukleotids im 5'-Primer wurde eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Hyp*CH4 IV eingefügt (siehe Kap.3.3.2). Diese Erkennungssequenz (5' AICGT) war im Falle des Vorliegens des G-Allels vorhanden, im Falle des Vorliegens des T- oder C-Allels jedoch nicht. Nach Restriktionsverdau mit *Hyp*CH4 IV entstanden so bei Vorliegen des G-Allels zwei Fragmente (93 bp + 34 bp), bei Vorliegen des T- oder C-Allels wurde das 127 bp lange PCR-Produkt nicht geschnitten. Die Fragmente wurden schließlich in einem 3%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anhand des Bandenmusters genotypisiert.

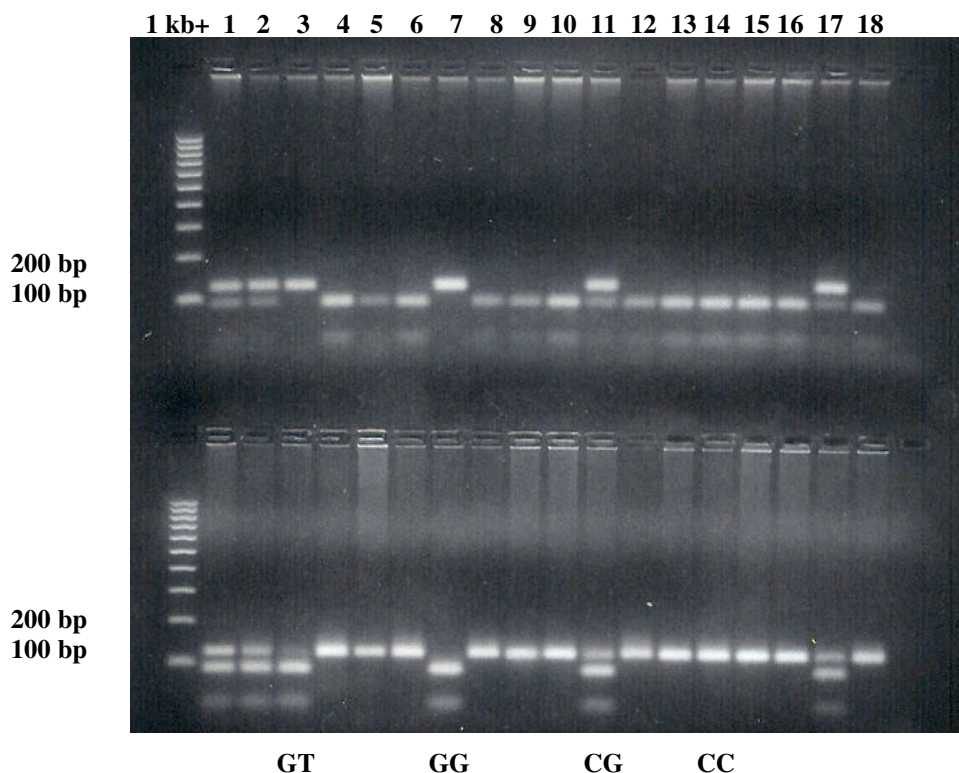


Abbildung 21: Typisierung des Einzelnukleotidpolymorphismus -725 C/G/T. Die Abbildung zeigt 18 der untersuchten DNA-Proben. Die DNA-Proben wurden jeweils mit dem Primerpaar HLAG725F2 und HLAG725R (oberer Abschnitt) bzw. mit dem Primerpaar HLAG725F3 und HLAG725R (unterer Abschnitt) amplifiziert, anschließend mit den Restriktionsenzymen *Stu* I (oberer Abschnitt) bzw. *Hyp*CH4 IV (unterer Abschnitt) verdaut und in einem 3%igen Agarosegel aufgetrennt. Vier Amplifikate, welche bezüglich des Polymorphismus homozygot für das C-Allel (CC, Nr. 14), homozygot für das G-Allel (GG, Nr. 7) oder heterozygot (CG, Nr. 11 bzw. GT, Nr. 3) sind, wurden beispielhaft beschriftet. Die Größen für zwei Banden des Längenstandards 1 kb+ sind ebenfalls angegeben. Die DNA-Proben

stammen in aufsteigender Reihenfolge von den im Anhang tabellarisch aufgeführten Kontrollindividuen 1-18. Die Individuen Nr. 2 und Nr. 6 wurden aufgrund ihres männlichen Geschlechts nachträglich aus der Kontrollgruppe ausgeschlossen und wurden in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

In den folgenden Tabellen sind die Allel- und Genotypfrequenzen der für diese Arbeit untersuchten Kollektive dargestellt. Da im CEPH-Kollektiv aus der SNP-Datenbank des NCBI nicht zwischen dem -725G- und dem -725T-Allel unterschieden wird, sind statt dessen die Allelfrequenzen eines 47 Individuen umfassenden Kollektivs kaukasischer Herkunft aus Tan et al. (2005) dargestellt.

	<b>PG-Patientinnen</b> <b>n=18 (%)</b>	<b>Väter</b> <b>n=13 (%)</b>	<b>Kinder</b> <b>n=7 (%)</b>	<b>Kontrollgruppe</b> <b>n=51 (%)</b>	<b>Tan et al.</b> <b>n=47 (%)</b>
<b>-725C</b>	30 (83)	22 (85)	11 (79)	93 (91)	81 (86)
<b>-725G</b>	4 (11)	4 (15)	2 (14)	8 (8)	11 (12)
<b>-752T</b>	2 (6)	0	1 (7)	1 (1)	2 (2)

Tabelle 16: Allelfrequenzen für den SNP -725 C/G/T in der 5'-regulatorischen Region von *HLA-G* bei PG-Patientinnen, Vätern, Kindern, Kontrollindividuen und einem Kollektiv kaukasischer Herkunft aus Tan et al. (2005). Da jeweils zwei *HLA-G*-Allele exprimiert werden, sind die Fallzahlen verdoppelt.

	<b>PG-Patientinnen</b> <b>n=18 (%)</b>	<b>Väter</b> <b>n=13 (%)</b>	<b>Kinder</b> <b>n=7 (%)</b>	<b>Kontrollgruppe</b> <b>n=51 (%)</b>
<b>-725CC</b>	13 (72)	9 (69)	4 (57)	44 (86)
<b>-752CG</b>	2 (11)	4 (31)	2 (29)	5 (10)
<b>-725CT</b>	2 (11)	0	1 (14)	0
<b>-725GG</b>	1 (6)	0	0	1 (2)
<b>-752GT</b>	0	0	0	1 (2)
<b>-725TT</b>	0	0	0	0

Tabelle 17: Genotypfrequenzen für den SNP -725 C/G/T in der 5'-regulatorischen Region von *HLA-G* bei PG-Patientinnen, Vätern, Kindern und Kontrollindividuen.

Das häufigste Allel stellt das C-Allel mit Frequenzen zwischen 79 und 91% in den untersuchten Kollektiven dar. Nur selten findet sich dagegen das T-Allel, dessen Frequenz lag in den untersuchten Kollektiven zwischen 0 und 6%. Als positiver Risikofaktor für den statistischen Vergleich der Kollektive von PG-Patientinnen, Vätern und Kindern mit dem Kontrollkollektiv wurde das seltenere T-Allel sowie, aufgrund der von Ober et al. (2003) beschriebenen Assoziation mit habituellen Aborten, das G-Allel angenommen. Bezüglich der Allelfrequenzen ergaben sich unter Verwendung des Exakten Tests nach Fisher keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Kollektiven (angenommener Risikofaktor T: PG-Patientinnen  $p= 0,17$ , Väter  $p= 1,00$ , Kinder  $p= 0,23$ ; angenommener Risikofaktor G: PG-Patientinnen  $p= 0,51$ , Väter  $p= 0,26$ , Kinder  $p= 0,35$ ).

Die Testung der Genotypfrequenzen blieb wegen der Seltenheit der Genotypen CT, GG, GT und TT auf die Fälle CG versus nicht-CG und nicht-CC versus CC beschränkt. Bei der Testung mittels des Exakten Tests nach Fisher fielen beim Vergleich der Kollektive der Väter (angenommener Risikofaktor CG: Väter  $p= 0,07$ ) und der Kinder (angenommener Risikofaktor nicht-CC: Kinder  $p= 0,09$ )  $p$ -Werte kleiner 0,1 auf. Dies könnte als Hinweis für eine Rolle väterlicher und kindlicher Genotypkonstellationen für die Auslösung eines Pemphigoid gestationis bei der Mutter gewertet werden. Weitere Untersuchungen an einem größeren Kollektiv könnten hier Aufschluss geben.

### 5.3 Familienstammbäume

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, sofern DNA-Proben verfügbar waren, auch Partner und Kinder der Pemphigoid-gestationis-Patientinnen hinsichtlich der relevanten Polymorphismen typisiert. Es lag daher nahe, die genetische Konstellation innerhalb der Familien als Stammbaumdiagramm darzustellen um eventuelle Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu verdeutlichen, die im Rahmen der statistischen Auswertung nicht erfasst wurden. Sofern Daten zur Typisierung bezüglich der klassischen HLA-Gene zur Verfügung standen, wurden diese ebenfalls in das Stammbaumdiagramm aufgenommen.

Es konnten insgesamt vier Familienstammbäume erstellt werden:

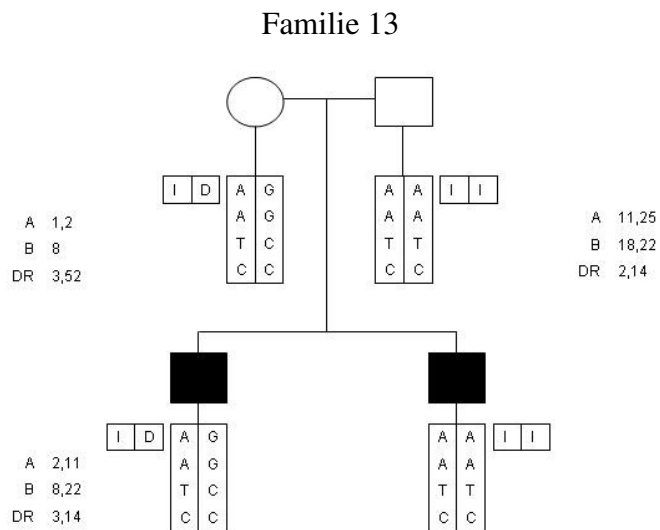


Abbildung 22: Dargestellt sind Mutter, Vater und zwei Söhne der Familie 13. Beide Schwangerschaften lösten PG aus (gekennzeichnet durch Schwarzfärbung des jeweiligen Symbols). Die Ergebnisse der Typisierung hinsichtlich des 14-bp-Indel-Polymorphismus sind mit I (Insertion) und D (Deletion) angegeben. Die Ergebnisse der Typisierung der Promotorpolymorphismen sind unterhalb des Personensymbols jeweils in der Reihenfolge -1306, -964, -762, -725 tabellarisch aufgeführt. Ergebnisse der Typisierung bezüglich der klassischen HLA-Gene sind neben den Personensymbolen aufgeführt (A= HLA-A, B= HLA-B, DR= HLA-DR).

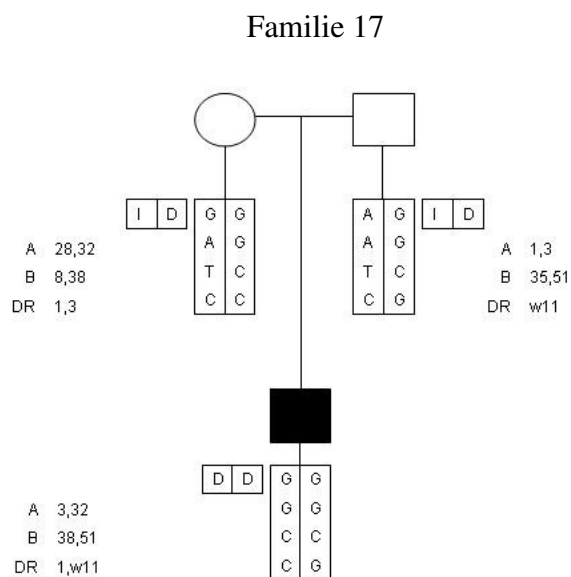


Abbildung 23: Dargestellt sind Mutter, Vater und Sohn der Familie 17. Die Schwangerschaft war durch PG verkompliziert. Die Ergebnisse der Typisierung hinsichtlich des 14-bp-Indel-Polymorphismus sind mit I (Insertion) und D (Deletion) angegeben. Die Ergebnisse der Typisierung der Promotorpolymorphismen sind unterhalb des Personensymbols jeweils in der Reihenfolge -1306, -964, -762, -725 tabellarisch aufgeführt. Ergebnisse der Typisierung bezüglich der klassischen HLA-Gene sind neben den Personensymbolen aufgeführt (A= HLA-A, B= HLA-B, DR= HLA-DR).

## Familie 11

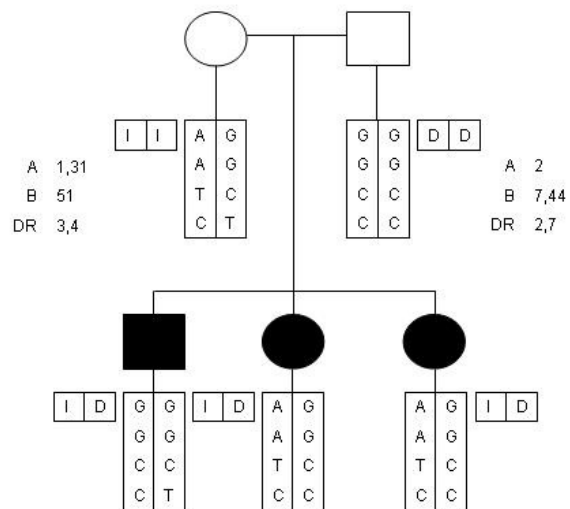


Abbildung 24: Dargestellt sind Mutter, Vater und drei Kinder der Familie 11. Alle drei Schwangerschaften lösten PG bei der Mutter aus. Die Ergebnisse der Typisierung hinsichtlich des 14-bp-Indel-Polymorphismus sind mit I (Insertion) und D (Deletion) angegeben. Die Ergebnisse der Typisierung der Promotorpolymorphismen sind unterhalb des Personensymbols jeweils in der Reihenfolge -1306, -964, -762, -725 tabellarisch aufgeführt. Ergebnisse der Typisierung bezüglich der klassischen HLA-Gene sind neben den Personensymbolen aufgeführt (A= HLA-A, B= HLA-B, DR= HLA-DR).

## Familie 4

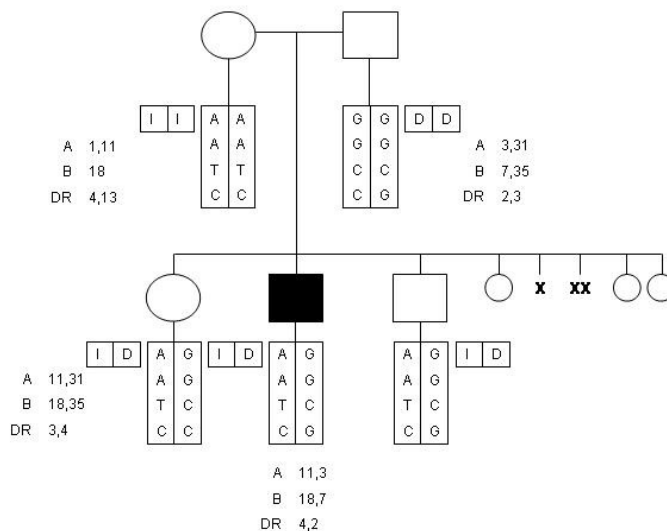


Abbildung 25: Dargestellt sind Mutter, Vater und drei Kinder der Familie 4. Nur die zweite Schwangerschaft war durch PG verkompliziert (gekennzeichnet durch Schwarzfärbung des jeweiligen Symbols). Die Ergebnisse der Typisierung hinsichtlich des 14-bp-Indel-Polymorphismus sind mit I (Insertion) und D (Deletion) angegeben. Die Ergebnisse der Typisierung der Promotorpolymorphismen sind unterhalb des Personensymbols jeweils in der Reihenfolge -1306, -964, -762, -725 tabellarisch aufgeführt. Ergebnisse der Typisierung bezüglich der klassischen HLA-Gene sind neben bzw. unter den Personensymbolen aufgeführt (A= HLA-A, B= HLA-B, DR= HLA-DR).



Die bekannte Assoziation der HLA-Allele HLA-DR3 und HLA-DR4 sowie ihrer Kombination HLA-DR3/4 bei Pemphigoid-gestationis-Patientinnen zeigt sich an allen vier Stammbäumen. Bei den Vätern konnte in drei Fällen die bekannte Assoziation mit HLA-DR2 beobachtet werden (siehe Abbildungen 22, 24 und 25). Eine augenscheinliche Übereinstimmung bezüglich des 14-bp-Indel-Polymorphismus oder der untersuchten Promotorpolymorphismen bei den Pemphigoid-gestationis-Patientinnen, den Vätern oder Kindern ist nicht festzustellen. Eine Diskussion der genetischen Konstellationen der vier hier dargestellten Familienstammbäume erfolgt in Kapitel 6.

## 6. Diskussion

Der 14-bp-Indel-Polymorphismus scheint spezifisch für den Menschen zu sein (Castro et al. 2000). Untersuchungen an Primaten zeigten durchwegs ein Vorhandensein der 14-bp-Insertion im *HLA-G*-Gen, weshalb diese Allelvariante auch als evolutionär älter angesehen wird. Dennoch stellt das Insertionsallel in verschiedenen ethnischen Gruppen das seltenere Allel dar (NCBI 2008). Deshalb wird angenommen, dass die Deletionsvariante funktionelle Konsequenzen haben könnte, die zur Selektion dieses Allels geführt haben. So konnte gezeigt werden, dass sowohl die mRNA-Menge, als auch die HLA-G Expression auf Trophoblastzellen bei der Deletionsvariante höher sind (Hiby et al. 1999, Hviid et al. 2003). Darüber hinaus konnten einige schwangerschaftsassozierte Krankheitsbilder mit dem 14-bp-Indel-Polymorphismus in Zusammenhang gebracht werden. In einer dänischen Studie hatten Frauen, die homozygot für das Insertionsallel waren, ein signifikant erhöhtes Risiko für habituelle Aborte (Hviid et al. 2002). In Plazenten betroffener Frauen wurde auch eine geringere HLA-G Expression beobachtet (Emmer et al. 2002). Dies könnte durch die geringere *HLA-G*-mRNA-Menge in Trophoblasten bei Trägern des Insertionsallels erklärt werden. Außerdem gelang in zwei unabhängigen Studien bei homozygoten Trägern der Insertionsvariante kein Nachweis von löslichem HLA-G1 (sHLA-G1 oder HLA-G5) im Blut (Hviid et al. 2004a, Rizzo et al. 2005). Gelang im Zellüberstand von Präimplantationsembryonen für In-vitro-Fertilisationen kein Nachweis von sHLA-G, so war dies mit einer signifikant reduzierten Implantationsrate korreliert (Pfeiffer et al. 2000, Yie et al. 2005). Unter Umständen könnte eine verminderte Implantationsrate von Embryonen, die homozygot für das Insertionsallel sind, so zur Selektion der Deletionsvariante beim Menschen geführt haben.

Eine weitere pathologisch relevante schwangerschaftsassozierte Erkrankung, die Präeklampsie, könnte ebenfalls eine Assoziation mit dem 14-bp-Indel-Polymorphismus aufweisen. Ähnlich wie beim Pemphigoid gestationis ist die Ätiologie der Präeklampsie unklar. Es wird eine multifaktorielle Genese mit Beteiligung mütterlicher und fetaler Faktoren ebenso wie eine immunologische Genese angenommen. Es konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass das Risiko für erstgebärende Mütter an Präeklampsie zu erkranken, signifikant erhöht ist, wenn der Fetus homozygot für die 14-bp-Insertion ist (O'Brien et al. 2001, Hylenius et al. 2004). Ein Erklärungsansatz hierfür könnte eine

verringerte *HLA-G*-mRNA-Menge und *HLA-G* Expression in der Plazenta bei diesem fetalen Genotyp sein. Yie et al. (2008) konnten zuletzt ein erhöhtes Präeklampsierisiko bei verminderter plazentarer *HLA-G* Expression nachweisen. Interessanterweise konnte auch das Krankheitsbild des Pemphigus vulgaris mit dem 14-bp-Indel-Polymorphismus in Zusammenhang gebracht werden. Dieser zählt, ebenso wie das Pemphigoid gestationis, zu den blasenbildenden Autoimmunerkrankungen der Haut. Als Autoantigen fungiert beim Pemphigus vulgaris Desmoglein, ein desmosomales Adhäsionsmolekül der Keratinozyten. In einer Studie mit 30 jüdischen Pemphigus-vulgaris-Patienten und 30 Kontrollindividuen, die nach Gesichtspunkten der Übereinstimmung bezüglich der klassischen *HLA*-Loci ausgewählt wurden, konnte eine statistisch signifikante Häufung des Deletionsallels bei den Pemphigus-vulgaris-Patienten nachgewiesen werden (Gazit et al. 2004). Zusätzlich war bei den Pemphigus-vulgaris-Patienten als auch bei den Kontrollindividuen das Insertionsallel, anders als in der Literatur beschrieben, das häufigere Allel. Die Frequenz des Insertionsallels betrug bei den Patienten 0,57 und bei den Kontrollindividuen 0,82. Die Pemphigus-vulgaris-Patienten und die analog ausgewählten Kontrollindividuen waren in dieser Studie mehrheitlich *HLA-A26* positiv. Dieses Allel ist ein bekannter Risikofaktor für den Pemphigus vulgaris bei jüdischen Patienten (Mobini et al. 1997). Dennoch besteht laut der Autoren kein Kopplungsungleichgewicht zwischen *HLA-A* und *HLA-G*, das die Häufung von *HLA-G*-Allelen, die die 14-bp-Insertion tragen, erklären könnte. Aufgrund der Beteiligung von *HLA-G* bei zahlreichen Immunprozessen wie etwa der Antigenpräsentation und der Interaktion mit Zellen des Immunsystems halten die Autoren auch eine Rolle von *HLA-G* bei der Entstehung von Antikörpern gegen Desmoglein für möglich. Insbesondere die Hinweise auf einen Einfluss des 14-bp-Indel-Polymorphismus auf die Menge der *HLA-G* Expression sollen diese Hypothese stützen. Darüber hinaus konnte auch für eine weitere Autoimmunerkrankung, den systemischen Lupus erythematoses, kürzlich in einem italienischen Kollektiv für Träger des Insertionsallels und des Genotyps homozygot für die Insertion ein signifikant höheres Erkrankungsrisiko nachgewiesen werden (Rizzo et al. 2008).

Betrachtet man die Häufigkeitsverteilung von Insertions- und Deletionsallel bei den Pemphigoid-gestationis-Patientinnen der vorliegenden Arbeit, so konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe gefunden werden. Dennoch fällt auf, dass das Insertionsallel auch in dieser Gruppe mit 58% das häufigere Allel ist, während es in den in der Literatur erwähnten unselektierten Kollektiven durchwegs als selteneres Allel

vorkommt. Für die vorliegende Studie wurde das Kontrollkollektiv allerdings nicht, wie in der Studie mit den Pemphigus-vulgaris-Patienten von Gazit et al. (2004), aufgrund einer Übereinstimmung von HLA-Loci, sondern rein zufällig ausgewählt. Es verwundert also nicht, dass hier das Insertionsallel mit 48% als selteneres Allel vorkommt. Obwohl das häufigere Vorkommen des Insertionsallels bei den Pemphigoid-gestationis-Patientinnen keine statistische Signifikanz aufweist, ist es dennoch auffällig. Insbesondere da in der Studie zum verwandten Krankheitsbild des Pemphigus vulgaris ebenfalls eine Häufung zu beobachten ist, wäre eine Untersuchung der Allelverteilung des 14-bp-Indel-Polymorphismus in einem größeren Kollektiv im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, die bezüglich der Verteilung der klassischen HLA-Antigene mit der Patientengruppe übereinstimmt, aufschlussreich.

Eine mögliche Erklärung für die unerwartete Häufung des Insertionsallels im Kollektiv der Pemphigoid-gestationis-Patientinnen (und im von Rizzo et al. (2008) untersuchten Lupus-erythematoses-Kollektiv) ist ein starkes Kopplungsungleichgewicht zwischen HLA-DR3 und dem für die Insertionsvariante kodierenden *HLA-G*-Allel\*010102. Es ist auch bekannt, dass das Pemphigoid gestationis, ebenso wie die Autoimmunerkrankungen Dermatitis herpetiformis, Morbus Basedow, Typ-I-Diabetes, Myasthenia gravis und systemischer Lupus erythematoses, mit HLA-DR3 assoziiert ist (Shornick et al. 1981, Tiwari und Terasaki 1985). Die Häufigkeit von HLA-DR3 bei Pemphigoid-gestationis-Patientinnen wird mit 60-80% angegeben (Shornick et al. 1981). Aus dem Patientinnenkollektiv, das im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, waren zehn Patientinnen bezüglich HLA-DR3 typisiert worden. Davon waren in Übereinstimmung mit den aus der Literatur bekannten Allelfrequenzen sechs Patientinnen Trägerinnen des HLA-DR3 Allels (60%) und fünf Patientinnen (83%) zugleich Trägerinnen des *HLA-G*-Insertionsallels. Hviid et al. (2005) beschrieben eine Assoziation des Haplotypen *HLA-DRB1\*03.DQA1\*05.DQB1\*02.G\*010102* mit habituellen Aborten. Da HLA-DR3 als MHC-Klasse-II-Protein vorwiegend auf antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems exprimiert wird, HLA-G dagegen vorwiegend auf Zellen des extravillösen Trophoblasten an der fetomaternalen Grenzzone, postulieren die Autoren eine wichtigere Rolle von HLA-G für die Auslösung habituelle Aborte. Auf die schwangerschaftsinduzierte Autoimmunerkrankung Pemphigoid gestationis übertragen, könnte die relative Häufung des 14-bp-Insertionsalles im untersuchten Patientinnenkollektiv als pathogenetischer Faktor vermutet werden und die bekannte Assoziation mit HLA-DR3 auf das starke genetische Kopplungsungleichgewicht mit *HLA-G\*010102* zurück zu

führen sein. Allerdings ist die Häufung des 14-bp-Insertionsallels im untersuchten kleinen Kollektiv im statistischen Vergleich mit dem Kontrollkollektiv nicht signifikant. Zudem war es nicht möglich, im Rahmen dieser Arbeit eine komplette HLA-Typisierung der Patientinnen vorzunehmen. Diese wird derzeit durchgeführt (Eckart und Messer, persönliche Mitteilung). Da es aber in jüngster Zeit vermehrte Hinweise für die Beteiligung von HLA-G an der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen gibt, ist eine pathogenetische Bedeutung des 14-bp-Indel-Polymorphismus auch für das Pemphigoid gestationis, wie sie bereits für die Krankheitsbilder Pemphigus vulgaris, systemischer Lupus erythematodes, habituelle Aborte, Präeklampsie und die Implantationsrate nach In-vitro-Fertilisation postuliert wird, nicht auszuschließen.

Während der Polymorphismus im *HLA-G*-Gen im Vergleich zu den klassischen HLA-Klasse-I-Genen äußerst beschränkt ist, fällt in der Promotorregion von *HLA-G* eine große Zahl an Einzelnukleotidpolymorphismen auf. Diese liegen zum Teil innerhalb oder in der Nähe von regulatorisch relevanten DNA-Sequenzen (Bindungsmotiven) (Ober et al. 2003, Tan et al. 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb vier gut untersuchte SNP aus der Promotorregion ausgewählt, um eine mögliche Bedeutung dieser Polymorphismen für die Erkrankungswahrscheinlichkeit am Pemphigoid gestationis zu analysieren. Dabei stellte sich heraus, dass drei der Polymorphismen (-1306, -964, -762) in einem Kopplungsungleichgewicht stehen, so dass der statistische Vergleich der Genotypfrequenzen und der Frequenzen der aus diesen drei SNP zusammengesetzten Haplotypen zwischen den Pemphigoid-gestationis-Patientinnen und ihren Angehörigen und denjenigen des Kontrollkollektivs für diese drei SNP nahezu identische p-Werte ergab (Ober et al. 2003, Tan et al. 2005). Beim Vergleich der Haplotyp- und Genotypfrequenzen von Patientinnen- und Kontrollkollektiv konnten keine statistisch signifikanten Abweichungen der Allel- und Genfrequenzen ermittelt werden (Haplotypverteilung:  $p=0,34$ , Genotypverteilung:  $p=0,51$ ).

Für den Einzelnukleotidpolymorphismus in der Position -725 konnte ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich von Patientinnen- und Kontrollkollektiv gefunden werden (Haplotyp:  $p=0,17$ , Genotyp:  $p=0,28$ ).

Der triallelische SNP -725C/G/T war zuvor mit einer höheren Spontanabortrate in einer Hutteritenpopulation in Verbindung gebracht worden, wenn beide Eltern Träger des G-Allels waren (Ober et al. 2003). Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten zwölf Paare

bezüglich des SNP an Position -725 typisiert werden. In nur einem Fall waren beide Eltern Träger des G-Allels an der betreffenden Position (beide besaßen den Genotyp CG). Interessanterweise waren gerade die Schwangerschaften dieser Patientin neben dem Pemphigoid gestationis durch Präeklampsie und einen Spontanabort kompliziert.

Beim Vergleich der Haplotyp- und Genotypfrequenzen von Partnern und Kindern der Pemphigoid-gestationis-Patientinnen mit dem Kontrollkollektiv fielen zum Teil grenzwertig signifikante p-Werte auf. Im Folgenden wird daher eine mögliche Rolle der untersuchten Promotorpolymorphismen im *HLA-G*-Gen der Väter als pathogenetischer Faktor für die Auslösung des Pemphigoid gestationis bei der Mutter diskutiert. Konkret ergaben sich für den Fall Vater besitzt den selteneren Haplotyp G-G-C ( $p=0,05$ ) oder den Genotyp GG-GG-CC ( $p=0,07$ ) bezüglich der Positionen -1306/-964/-762 sowie für den Fall Vater besitzt den Genotyp -725CG ( $p=0,07$ ) und Kind besitzt den Genotyp -725 nicht-CC ( $p=0,09$ ) auffällige p-Werte. Da für die Berechnungen der p-Werte der Exakte Test nach Fisher angewendet wurde, ist auch bei den kleinen Fallzahlen von einem grenzwertig signifikanten Ergebnis auszugehen. Dennoch kann eine zufällige Signifikanz im Sinne des Problems multipler Testungen beim mehrfachen Testen in kleinen Populationen nicht ausgeschlossen werden. Daher ist zukünftig eine Überprüfung der Ergebnisse an einem größeren Kollektiv sehr erstrebenswert, um eine verlässlichere Aussage treffen zu können.

Die fetalen Trophoblastzellen exprimieren während der Schwangerschaft kodominant jeweils das mütterliche und das väterliche *HLA-G*-Allel (Hviid et al. 1998). Zugleich kommt es an der fetomaternalen Grenzzone zum engen Kontakt zwischen dem genetisch semiallogenen Trophoblastgewebe des Embryos und immunkompetenten mütterlichen Zellen (siehe Kap.1.3.5). Zudem ist bekannt, dass der HLA-Klasse-II-Genotyp des Vaters auf das Erkrankungsrisiko der Mutter Einfluss nimmt. Ist dieser positiv für HLA-DR2, so ist das Risiko für die Mutter am Pemphigoid gestationis zu erkranken signifikant erhöht (Shornick et al. 1983a). Für die schwangerschaftsinduzierte Autoimmunerkrankung Pemphigoid gestationis wird daher schon seit längerem die Hypothese einer möglichen Histoinkompatibilität von väterlichen/fetalen und mütterlichen *HLA-G*-Antigenen als pathogenetischer Faktor diskutiert (Holmes et al. 1983, Messer et al. 1993, Jenkins et al. 1999). Grössere Studien, in denen von Pemphigoid gestationis betroffene Paare mit Kontrollpaaren hinsichtlich der *HLA-G*-

Antigenkompatibilität verglichen werden, wie sie etwa von Hviid et al. (2002) für von habituellen Aborten betroffene Paare durchgeführt wurden, fehlen bisher. Von besonderem Interesse sind daher die sogenannten „skip pregnancies“ (siehe Kap.1.1.2). Durch den Vergleich der genetischen Konstellationen innerhalb der betroffenen Familien ist eine Überprüfung der Hypothese der Histoinkompatibilität bezüglich bestimmter HLA-Antigene dennoch möglich. Holmes et al. (1983) vermuteten das Auftreten einer „skip pregnancy“ für den Fall, dass Mutter und Fetus gleiche Genotypen bezüglich des HLA-DR Locus besitzen. Jenkins et al. (1999) konnten eine derartige Konstellation, bei Mutter und Kind die den HLA-Typ DR3/4 besaßen, tatsächlich nachweisen. Allerdings beschrieben sie auch den Fall einer Mutter mit HLA-Genotyp DR7/11 und zwei genetisch bezüglich des HLA-DR Locus verschiedenen Kindern, die in einer ersten Schwangerschaft (Kind: HLA-DR2/7) an Pemphigoid gestationis erkrankte, in der darauf folgenden Schwangerschaft (Kind: HLA-DR2/11) aber rezidivfrei im Sinne einer „skip pregnancy“ blieb. Die Frage nach dem Pathomechanismus, durch welchen die väterliche Expression bestimmter HLA-DR-Allele auf das Erkrankungsrisiko der Frau Einfluss nimmt, bleibt also nach wie vor ungeklärt, zumal eine Expression von HLA-DR und anderen HLA-Klasse-II-Antigenen auf Trophoblasten nicht nachgewiesen werden konnte (Hutter et al. 1996, Hviid 2006). Allerdings fanden Borthwick et al. (1988) bei der immunhistochemischen Untersuchung von sieben Pemphigoid-gestationis-Plazenten eine aberrante Expression von MHC-II-Molekülen in Zellen des mesenchymalen Zottenstromas. Diese fetalen Zellen stehen normalerweise nicht in direktem Kontakt mit mütterlichen Zellen, von denen sie durch die Trophoblastzellen getrennt sind. Borthwick et al. (1988) postulierten, dass es im Falle eines Kontaktes von Zellen des mütterlichen Immunsystems mit fetalen Antigenen, welche durch MHC-Klasse-II-Moleküle auf plazentaren Stromazellen präsentiert werden, zur Auslösung einer Autoimmunreaktion kommen könnte. Eine Überprüfung der von Borthwick et al. (1988) erzielten Ergebnisse mit neueren molekularbiologischen Methoden wäre im Hinblick auf die Klärung der Beteiligung väterlicher MHC-Klasse-II-Molekülen an der Pathogenese des Pemphigoid gestationis daher unbedingt von Interesse.

Die mögliche funktionelle Rolle von Polymorphismen im *HLA-G*-Gen und im *HLA-G*-Promotor für die Entstehung der assoziierten Krankheitsbilder ist wohl eher durch eine Einflussnahme auf die Funktion von HLA-G anzunehmen. Die unmittelbare Nähe

zahlreicher Einzelnukleotidpolymorphismen der *HLA-G*-Promotorregion zu Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren oder regulatorischen Elementen könnte etwa über epigenetische Mechanismen eine veränderte Transkriptions- und Expressionsrate des Moleküls bedingen. So konnten Ober et al. (2003) zeigen, dass das G-Allel des SNP an der Position -725 ein CpG-Dinukleotid generiert und dass eine Methylierung des Cytosins an genomischer DNA stattfindet. Für JEG-3-Chorionkarzinomzellen konnte die Arbeitsgruppe schließlich zeigen, dass das G-Allel an der Position -725 eine signifikant höhere Expressionsrate für HLA-G bedingt (Ober et al. 2006). Die Ergebnisse der im Rahmen der Doktorarbeit durchgeführten Typisierung der Partner und Kinder von Pemphigoid-gestationis-Patientinnen zeigen einen deutlichen Trend bezüglich der Häufung des Vorkommens des -725G-Alles ( $p=0,07$  bzw.  $p=0,09$ ). Dem könnte, wie am Beispiel der JEG-3-Chorionkarzinomzellen gezeigt, eine höhere Expressionsrate von HLA-G in den Plazenten der betroffenen Schwangerschaften zu Grunde liegen. Die Frage ob und möglicherweise wie eine veränderte Expression von HLA-G in der Plazenta Einfluss auf die Bildung von Antikörpern gegen Kollagen-Typ-XVII-Moleküle der plazentaren Basalmembranzzone nimmt, bleibt allerdings bisher unbeantwortet.

Hinweise auf eine mögliche Bedeutung des väterlichen Promotorhaplotyps G-G-C bezüglich der Positionen -1306/-964/-762 ( $p=0,05$ ) für das Erkrankungsrisiko einer Frau für ein Pemphigoid gestationis müssen im Hinblick auf die ungewöhnliche Häufung von SNP in der Promotorregion von *HLA-G* und die teilweise unmittelbare Nähe dieser SNP zu regulatorischen Sequenzen interpretiert werden. Mechanismen, mittels derer Allelvarianten von Einzelnukleotidpolymorphismen der Promotorregion Einfluss auf die Transkription- oder Expression, das Verteilungsmuster der HLA-G-Isoformen oder anderer Funktionen von HLA-G nehmen, sind bislang allerdings kaum untersucht worden. Ober et al. (2006) bemerken, dass neben dem SNP an der Position -725 weitere sieben von 22 bekannten SNP der *HLA-G*-Promotorregion ein CpG-Dinukleotid generieren können. Zu diesen zählen auch der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte SNP an der Position -964 sowie die SNP an den Positionen -1179, -689, -666, -646, -509 und -477. Verschiedenen Methylierungsmustern unterschiedlicher Promotorhaplotypen von *HLA-G* könnte so eine funktionelle Bedeutung bei der quantitativen und gewebespezifischen Expression zukommen. Klinische Assoziationen verschiedener Einzelnukleotidpolymorphismen der Promotorregion mit Krankheitsbildern wie Asthma bronchiale, Spontanaborten und möglicherweise Pemphigoid



gestationis lassen auf ein verstärktes Interesse an der Aufklärung der zu Grunde liegenden Mechanismen hoffen (Pfeiffer et al. 2001, Ober et al. 2003, Nicolae et al. 2005).

Messer et al. (1993) postulierten bereits, dass das Zusammentreffen von Autoimmunphänomenen, semiallogenem plazentarem Gewebe und hormonellen Einflüssen einer Schwangerschaft maßgeblich an der Ätiopathogenese des Pemphigoid gestationis beteiligt sein könnte. Aufgrund folgender klinischer Beobachtungen ist der Einfluss hormoneller Faktoren auf die Pathogenese des Pemphigoid gestationis anzunehmen:

(1) Das Pemphigoid gestationis tritt nur während oder kurz nach einer Schwangerschaft oder sehr selten im Zusammenhang mit schwangerschaftsassozierten Tumoren auf (siehe Kap.1.1.2).

(2) Häufig ist eine relative Verminderung der Krankheitsaktivität in der Spätschwangerschaft, gefolgt von einer postpartalen Exazerbation zu beobachten. Dieses Phänomen korreliert zeitlich mit einem hohen Progesteronspiegel gegen Ende der Schwangerschaft, der bald nach der Entbindung abrupt abfällt (Holmes et al. 1982a, Shornick 1987).

(3) Viele Frauen berichten von einer Exazerbation des Pemphigoid gestationis um den Zeitpunkt der ersten postpartalen Menstruationsblutungen (Holmes et al. 1983, Shornick et al. 1983b, Messer et al. 1993). Physiologischerweise ist die Menstruation durch ein Absinken des Progesteronspiegels bedingt.

(4) Die Einnahme hormoneller Kontrazeptiva kann zu einer Symptomverstärkung bzw. zu einem Rezidiv führen. In zwei Fällen wurde zudem über die Gabe reiner Progesteronpräparate statt eines Kombinationspräparates aus Östrogen und Progesteron berichtet, welche kein Rezidiv bewirkten (Holmes et al. 1983, Shornick et al. 1983b).

(5) Ein positiver Effekt des Stillens auf die postpartale Krankheitsdauer wurde beobachtet (Holmes et al. 1983).

(6) Ein Therapieversuch mit Goserelin, einem Analogon des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH), das eine hypophysäre Suppression des follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des luteinisierenden Hormons (LH) bewirkt, konnte die komplette Remission eines Pemphigoid gestationis erreichen (Garvey et al. 1992). Daher stellt sich die Frage nach einer immunsuppressiven Wirkung von Progesteron und möglicherweise von Prolaktin bei Pemphigoid gestationis (Holmes et al. 1983,

Schirren et al. 1993, Engineer et al. 2000). Ein immunmodulatorischer Effekt von Progesteron während der Schwangerschaft ist gut dokumentiert und wird mit einem milderem Verlauf einiger Autoimmunerkrankungen während der Schwangerschaft in Zusammenhang gebracht (Stites und Siiteri 1983, Engineer et al. 2000, Arck et al. 2007).

Yie et al. (2006b) beschrieben im *HLA-G*-Promotor eine Bindungsstelle für den Progesteronrezeptor, ein Progesteron-response-Element (PRE). Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Progesteron eine Hochregulierung der *HLA-G* Expression in JEG-3-Chorionkarzinomzellen und Zytotrophoblasten bewirkt und postuliert daher, dass ein möglicher Mechanismus der bekannten immunmodulatorischen Wirkung von Progesteron während der Schwangerschaft in einer Hochregulierung von *HLA-G* in Trophoblastzellen bestehen könnte (Yie et al. 2006a).

Ein Einzelnukleotidpolymorphismus an der Position -56 im *HLA-G*-Promotor befindet sich nur vier Basen stromaufwärts des von Yie et al. (2006b) beschriebenen Progesteron-response-Elementes und könnte über eine Modifikation der Bindungsfähigkeit des Progesteronrezeptors Einfluss auf die *HLA-G* Transkription nehmen (siehe Abbildung 12). Da sich dieser SNP nicht in einem Kopplungsungleichgewicht mit den bislang im Zusammenhang mit Pemphigoid gestationis untersuchten Polymorphismen befindet, wären weitere Untersuchungen im Hinblick auf eine mögliche Bedeutung dieses Einzelnukleotidpolymorphismus zukünftig von hohem Interesse.

Eine mögliche Rolle bestimmter väterlicher *HLA-G*-Allele bei der Auslösung eines Pemphigoid gestationis bei der Mutter wird im Folgenden anhand der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Familienstammbäume diskutiert. Ein gemeinsamer Haplotyp bezüglich der untersuchten Positionen lässt sich, wie auch der statistische Vergleich nahe legt, weder für die von Pemphigoid gestationis betroffenen Frauen, noch ihre Partner oder Kinder nachweisen. Aus dem statistischen Vergleich hatten sich allerdings Hinweise auf eine mögliche Bedeutung des väterlichen Haplotyps G-G-C bzw. des Genotyps GG-GG-CC bezüglich der Positionen -1306/-964/-762 sowie -725CG ergeben. Im Hinblick auf diese Ergebnisse ist insbesondere die Familie 4 zu nennen (siehe Abbildung 25). Bei dieser Familie trat der sehr seltene Fall eines Pemphigoid gestationis in einer Schwangerschaft auf, auf welche vier unauffällige Schwangerschaften folgten. Bislang wurde in der Literatur nur ein Fall mit drei unbeteiligten Schwangerschaften nach einer von Pemphigoid gestationis betroffenen Schwangerschaft beschrieben (Black und

Najem 2005). Der Vater der Familie besitzt die fragliche Risikokonstellation GG-GG-CC bezüglich der Positionen -1306/-964/-762 sowie -725CG. Zudem ist der Vater homozygot für das 14-bp-Deletionsallel. Die Mutter besitzt den Genotyp AA-AA-TT bezüglich der Positionen -1306/-964/-762 und ist homozygot für das 14-bp-Insertionsallel. Aufgrund dieser genetischen Konstellation sind alle Kinder heterozygot im Hinblick auf diese Positionen. Das G-Allel an der Position -725 wurde vom Vater an zwei der drei typisierten Kinder der Familie 4 vererbt. Vergleicht man die genetische Konstellation der Kinder untereinander, so fällt auf, dass diese bis auf das -725G-Allel bezüglich der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen identisch sind. Das -725G-Allel wurde vom Vater sowohl in der von Pemphigoid gestationis betroffenen Schwangerschaft als auch in der darauffolgenden „skip pregnancy“ vererbt. Ebenfalls ließen sich aufgrund der untersuchten Positionen keine Unterschiede der Histokompatibilität zwischen der Mutter und den Kindern feststellen. Anhand dieses Familienstammbaums kann gefolgert werden, dass zusätzlich zu den hormonellen Faktoren und der bekannten Assoziation mit bestimmten HLA-DR-Allelen wahrscheinlich noch andere, bislang unbekannte genetische Faktoren, eine wichtige Rolle bei der Auslösung des Pemphigoid gestationis spielen müssen. Eine pathogenetische Beteiligung oder Indikatorfunktion der untersuchten Polymorphismen im *HLA-G*-Gen und *HLA-G*-Promotor kann basierend auf der Auswertung der vier in Kapitel 5.3 abgebildeten Familienstammbäume derzeit weder untermauert noch ausgeschlossen werden.

Die vollständige Klärung der Frage, welche genetischen und hormonellen Faktoren der Auslösung einer Autoimmunreaktion gegen Kollagen-Typ-XVII-Moleküle in der Plazenta und der dermoepidermalen Junktionszone zu Grunde liegen, wird weiteren Studien an größeren Kollektiven überlassen bleiben. Die Erforschung der Pathomechanismen dieser seltenen schwangerschaftsinduzierten Autoimmundermatose hat Modellcharakter sowohl für die Gruppe der blasenbildenden Autoimmundermatosen als auch für die Interaktion der Steuerungsmechanismen zwischen Mutter und Fetus auf molekularer und immunologischer Ebene.

## 7. Zusammenfassung

Pemphigoid gestationis ist eine seltene blasenbildende Autoimmundermatose unklarer Ätiologie, die ausschließlich im Zusammenhang mit Schwangerschaften oder schwangerschaftsassozierten Tumoren beobachtet wird. Als Autoantigen konnte das Transmembranprotein Kollagen-Typ-XVII, ein Strukturelement der Hemidesmosomen der dermoepidermalen Junctionszone, identifiziert werden. Der selbstlimitierende Krankheitsverlauf und die hohe Rezidivneigung bei Folgeschwangerschaften deuten auf eine pathogenetische Rolle schwangerschaftsspezifischer Veränderungen endokriner sowie immunologischer Faktoren hin. Es besteht darüber hinaus eine Assoziation mit den MHC-Klasse-II-Antigenen HLA-DR3 und -DR4 bei den Patientinnen sowie mit dem väterlichen Haplotypen HLA-DR2.

HLA-G ist ein nicht-klassisches MHC-Klasse-Ib-Molekül, das hauptsächlich von den extravillösen Trophoblasten der Plazenta exprimiert wird. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass HLA-G an der fetomaternalen Grenzzone durch Interaktion mit Rezeptoren auf natürlichen Killerzellen, B- und T-Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen maßgeblich an der Tolerierung des semiallogenen Feten durch die mütterliche Immunabwehr beteiligt ist. Es wird postuliert, dass HLA-G auch an pathologischen Prozessen ausserhalb der Schwangerschaft, wie etwa Autoimmun- und Tumorerkrankungen, beteiligt sein könnte. *HLA-G* weist im Gegensatz zu den klassischen HLA-Klasse-I-Genen einen stark beschränkten Polymorphismus auf.

In dieser Arbeit wurde erstmals eine mögliche Assoziation zwischen Polymorphismen im *HLA-G*-Gen und in der *HLA-G*-Promotorregion mit dem Pemphigoid gestationis untersucht. Ein potentiell funktioneller 14-bp-Insertions-Deletions-Polymorphismus in Exon 8 von *HLA-G* (rs1704) sowie vier Einzelnukleotidpolymorphismen der Promotorregion (rs1736936, rs1632947, rs1632946, rs1233334) wurden in einem Kollektiv, welches 18 Pemphigoid-gestationis-Patientinnen umfasst, genotypisiert und mit einem Kontrollkollektiv bestehend aus 52 gesunden Blutspenderinnen verglichen. Aufgrund der bekannten Assoziation von Pemphigoid gestationis mit dem Haplotyp HLA-DR2 wurden auch Kinder und Partner der Pemphigoid-gestationis-Patientinnen hinsichtlich dieser Polymorphismen typisiert und mit dem Kontrollkollektiv verglichen. Sofern DNA-Proben von kompletten Familien gewonnen werden konnten, wurden die Ergebnisse der Typisierung in Stammbaumdiagrammen dargestellt.

Der 14-bp-Insertions-Deletions-Polymorphismus war in früheren Studien bereits mit anderen schwangerschaftsassozierten Krankheitsbildern sowie mit der blasenbildenden Autoimmundermatose Pemphigus vulgaris in Zusammenhang gebracht worden. In den hier untersuchten Kollektiven der Pemphigoid-gestationis-Patientinnen und ihrer Angehörigen konnte keine statistisch signifikante Assoziation zum Pemphigoid gestationis nachgewiesen werden. Auffällig war jedoch eine sehr deutliche relative Häufung des in der Allgemeinbevölkerung seltener vorkommenden Insertionsallels in der Patientinnengruppe. Zu Grunde liegend könnte ein bekanntes starkes Kopplungsungleichgewicht zwischen dem mütterlichen Risikoallel für Pemphigoid gestationis, HLA-DR3, und einem für die 14-bp-Insertionsvariante kodierenden *HLA-G*-Allel sein. Die vier untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen der Promotorregion von *HLA-G* zeichnen sich durch ihre Lage innerhalb oder in der Nähe funktioneller Elemente und/oder eine bereits bekannte klinische Assoziation aus. Drei der untersuchten Polymorphismen (rs1736936, rs1632947, rs1632946) befanden sich in einem nahezu vollständigen Kopplungsungleichgewicht. Beim statistischen Vergleich der untersuchten Kollektive zeigte sich für die drei gekoppelten Einzelnukleotidpolymorphismen eine grenzwertig signifikante Assoziation bzw. eine Tendenz in Richtung einer Assoziation bestimmter väterlicher Allele und Genotypen mit dem Pemphigoid gestationis (die p-Werte lagen zwischen 0,05 und 0,07). Für den Einzelnukleotidpolymorphismus rs1233334 konnte ebenfalls ein deutlicher Trend hin zu bestimmten väterlichen und kindlichen Genotypenkonstellationen im Vergleich zum Kontrollkollektiv ausgemacht werden (p-Werte zwischen 0,07 und 0,09).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine mögliche Assoziation der untersuchten Polymorphismen im *HLA-G*-Gen bei Vätern und Kindern von Pemphigoid-gestationis-Patientinnen mit dem Erkrankungsrisiko der Frauen im untersuchten Kollektiv hin. Es bleibt weiterführenden Studien überlassen, diese Ergebnisse an einem größeren Patientinnen- und Angehörigenkollektiv zu vergleichen und so möglicherweise zur Klärung der Ätiopathogenese dieser seltenen Autoimmunerkrankung beizutragen.

## 8. Literaturverzeichnis

- Aldrich CL, Stephenson MD, Karrison T, Odem RR, Branch DW, Scott JR, Schreiber JR, Ober C (2001) HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 7: 1162-1172
- Ambros-Rudolph CM, Müllegger RR, Vaughan-Jones SA, Kerl H, Black MM (2006) The specific dermatoses of pregnancy revisited and reclassified: results of a retrospective two-center study on 505 pregnant patients. *J Am Acad Dermatol* 54: 395-404
- American Academy of Pediatrics Committee on drugs (1994) The transfer of drugs and other chemicals into human milk. *Pediatrics* 93: 137-150
- Apps R, Gardner L, Moffet A (2008) A critical look at HLA-G. *Trends Immunol* 29: 313-321
- Aractingi S, Briand N, Le Dauff C, Viguier M, Bachelez H, Michel L, Dubertret L (2001) HLA-G and NK receptor are expressed in psoriatic skin: a possible pathway for regulating infiltrating T cells? *Am J Pathol* 159: 71-77
- Arck P, Hansen PJ, Mulac Jericevic B, Piccinni MP, Szekeres-Bartho J (2007) Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *Am J Reprod Immunol* 58: 268-279
- Black MM, Najem NM (2005) Remarkable follow-up experiences of a severe persistent case of pemphigoid gestationis. *Clin Exp Dermatol* 30: 593-594
- Borradori L (1994) Specific dermatoses of pregnancy. *Arch Dermatol* 130: 778-780
- Borthwick GM, Holmes RC, Stirrat GM (1988) Abnormal expression of class II MHC antigens in placentae from patients with pemphigoid gestationis: analysis of class II MHC subregion product expression. *Placenta* 9: 81-94
- Boulinguez S, Bedeane C, Prost C, Bernard P, Labbe L, Bonnetblanc JM (2003) Chronic pemphigoid gestationis: Comparative clinical and immunopathological study of 10 patients. *Dermatology* 206: 113-119
- Castro MJ, Morales P, Martinez-Laso J, Allende L, Rojo-Amigo R, Gonzalez-Hevilla M, Varela P, Moreno A, Garcia-Berciano M, Arnaiz-Villena A (2000) Evolution of HLA-G in humans and primates based on three new 3'UT polymorphisms. *Hum Immunol* 61: 1157-1163
- Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J (2004) TH1/TH2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm. *Int Arch Allergy Immunol* 2004 134: 93-119

- Chimanovitch I, Schmidt E, Messer G, Döpp R, Partscht K, Bröcker EB, Giudice GJ, Zillikens D (1999) IgG1 and IgG3 are the major immunoglobulin subclasses targeting epitopes within the NC16A domain of BP180 in pemphigoid gestationis. *J Invest Dermatol* 113: 140-142
- Cianchini G, Masini C, Lupi F, Corona R, De Pita O, Puddu P (2007) Severe persistent pemphigoid gestationis: long-term remission with rituximab. *Br J Dermatol* 157: 388-389
- Colbern GT, Chiang MH, Main EK (1994) Expression of the nonclassic histocompatibility antigen HLA-G by preeclamptic placenta. *Am J Obstet Gynecol* 70: 1244-1250
- Creput C, Le Friec G, Bahri R, Amiot L, Charpentier B, Carosella E, Rouas-Freiss N, Durrbach A (2003) Detection of HLA-G in serum and graft biopsy associated with fewer acute rejections following combined liver-kidney transplantation: possible implications for monitoring patients. *Hum Immunol* 64: 1033-1038
- Crisa L, McMaster MT, Ishii JK, Fisher SJ, Salomon DR (1997) Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. *J Exp Med* 186: 289-298
- Djahansouzi S, Nestle-Kraemling C, Dall P, Bender HG, Hanstein B (2003) Herpes gestationis may present itself as a paraneoplastic syndrome of choriocarcinoma- a case report. *Gynecol Oncol* 89: 334-337
- do Valle Chiossi MP, Costa RS, Ferreira Roselino AM (2000) Titration of herpes gestationis factor fixing to C3 in pemphigoid herpes gestationis associated with choriocarcinoma. *Arch Dermatol* 136: 129-130
- Dupont C (1974) Herpes gestationis with hydatiform mole. *Trans St Johns Hosp Dermatol Soc* 60: 103
- Elenkov IJ, Chrousos GP (2002) Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 966: 290-303
- Emmer PM, Steegers EA, Kerstens HM, Bulten J, Nelen WL, Boer K, Joosten I (2002) Altered phenotype of HLA-G expressing trophoblast and decidual natural killer cells in pathological pregnancies. *Hum Reprod* 17: 1072-1080
- Engineer L, Bhol K, Ahmed AR (2000) Pemphigoid gestationis: a review. *Am J Obstet Gynecol* 183: 483-491
- Farid NR (1987) Immunogenetics of autoimmune thyroid disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 16: 229-245
- Fernando MM, Stevens CR, Sabeti PC, Walsh EC, McWhinnie AJ, Shah A, Green T, Rioux JD, Vyse TJ (2007) Identification of two independent risk factors for lupus within the MHC in United Kingdom families. *PLoS Genet* 3: 192.

- Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P, Plenge RM, Vyse TJ, Rioux JD (2008) Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS Genet* 25: 1000024
- Fournel S, Aguerre-Girr M, Huc X, Lenfant F, Alam A, Toubert A, Bensussan A, Le Bouteiller P (2000) Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *J Immunol* 164: 6100-6104
- Franzke CW, Tasanen K, Schumann H, Brucker-Tuderman L (2003) Collagenous transmembrane proteins: Collagen XVII as a prototype. *Matrix Biol* 22: 299-309
- Fraser FC, Sajoo A (1995) Teratogenic potential of corticosteroids in humans. *Teratology* 51: 45-46
- GAMES, Transatlantic Multiple Sclerosis Genetics Cooperative (2003) A meta-analysis of whole genome linkage screens in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 143: 39-46
- Garcia-Gonzalez E, Castro-Llamas J, Karchmer S, Zuniga J, de Oca DM, Ambaz M, et al (1999) Class II major histocompatibility complex typing across the ethnic barrier in Pemphigoid gestationis: a study in Mexicans. *Int J Dermatol* 38: 46-51
- Garner EI, Goldstein DP, Feltmate CM, Berkowitz RS (2007) Gestational trophoblastic disease. *Clin Obstet Gynecol* 50: 112-122
- Garvey MP, Handfield-Jones SE, Black MM (1992) Pemphigoid gestationis – response to chemical oophorectomy with goserelin. *Clin Exp Dermatol* 17: 443-445
- Gazit E, Slomov Y, Goldberg I, Brenner S, Loewenthal R (2004) HLA-G is associated with pemphigus vulgaris in Jewish patients. *Hum Immunol* 65: 39-46
- Giudice GJ, Emery DJ, Zelickson BD, Anhalt GJ, Liu Z, Diaz LA (1993) Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Immunol* 151: 5742-5750
- Glas J, Török HP, Tonenchi L, Wetzke M, Beynon V, Teshome MY, Cotofana S, Schiemann U, Griga T, Klein W, Epplen JT, Folwaczny C, Folwaczny M, Mussack T, Weiss EH (2007) The 14-bp deletion polymorphism in the HLA-G gene displays significant differences between ulcerative colitis and Crohn's disease and is associated with ileocecal resection in Crohn's disease. *Int Immunol* 19: 621-626
- Gobin SJ, Biesta P, de Steenwinkel JE, Datema G, van den Elsen PJ (2002) HLA-G transactivation by cAMP-response element-binding protein (CREB). An alternative pathway to the conserved major histocompatibility complex (MHC) class I regulatory routes. *J Biol Chem* 277: 39525-39531
- Hanneken S, Hodzic-Avdagic N, Neumann NJ, Ruzicka T, Bruch-Gerharz D (2005) Postpartum persistent herpes gestationis. A therapeutic challenge. *Hautarzt* 56: 961-963



- Harman KE, Black MM (1999) High-dose intravenous immune globulin for the treatment of autoimmune blistering diseases: an evaluation of its use in 14 cases. *Br J Dermatol* 140: 865-874
- Harrison GA, Humphrey KE, Jakobsen IB, Cooper DW (1993) A 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene. *Hum Mol Genet* 2: 2200
- Hartung K, Baur MP, Coldewey R, Fricke M, Kalden JR, Lakomek HJ, Peter HH, Schendel D, Schneider PM, Seuchter SA, et al. (1992) Major histocompatibility complex haplotypes and complement C4 alleles in systemic lupus erythematosus. Results of a multicenter study. *J Clin Invest* 90: 1346-1351
- Herrero-Gonzalez J, Brauns O, Egner R, Röspeck W, Mascaro Jr Jm, Jonkman MF, Zillikens D, Sitaru C (2006) Immunoabsorption against two distinct epitopes on human type XVII collagen abolishes dermal-epidermal separation induced in vitro by autoantibodies from pemphigoid gestationis patients. *Eur J Immunol* 36: 1039-1048
- Hertl M, Schuler G (2002) Bullous autoimmune dermatoses. *Hautarzt* 53: 277-285  
Hertl, M (2009) Research in practice: Treatment of autoimmune bullous disorders. *J Dtsch Dermatol Ges* 7: 500-505
- Hiby SE, King A, Sharkey A, Loke YW (1999) Molecular studies of trophoblast HLA-G: polymorphism, isoforms, imprinting and expression in preimplantation embryo. *Tissue Antigens* 53: 1-13
- HLA Informatics Group (2008) <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG> (Stand: 23.12.2008)
- Holmes RC, Black MM, Dann J, James DC, Bhogal B (1982a) A comparative study of toxic erythema of pregnancy and herpes gestationis. *Br J Dermatol* 106: 499-510
- Holmes RC, Black MM (1982b) The specific dermatoses of pregnancy: a reappraisal with special emphasis on a proposed simplified clinical classification. *Clin Exp Dermatol* 7: 65-73
- Holmes RC, Black MM, Jurcka W (1983) Clues to the aetiology and pathogenesis of herpes gestationis. *Br J Dermatol* 109: 131-139
- Huilaja L, Hurskainen T, Autio-Harmainen H, Hofmann SC, Sormunen R, Räsänen J, Ilves M, Franzke CW, Bruckner-Tuderman L, Tasanen K (2008) Pemphigoid gestationis autoantigen, transmembrane collagen XVII, promotes the migration of cytotrophoblastic cells of placenta and is a structural component of fetal membranes. *Matrix Biol* 27: 190-200
- Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C (2005) HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J.* 19: 681-693
- Hutter H, Hammer A, Blaschitz A, Hartmann M, Ebbesen P, Dohr G, Ziegler A, Uchanska-Ziegler B (1996) Expression of HLA class I molecules in human first trimester and term placenta trophoblast. *Cell Tissues Res* 286: 439-447

Hviid TV, Meldgaard M, Sorensen S, Morling N (1997) Polymorphism of exon 3 of the HLA-G gene. *J Reprod Immunol* 35: 31-42

Hviid TV, Moller C, Sorensen S, Morling N (1998) Co-dominant expression of the HLA-G gene and various forms of alternatively spliced HLA-G mRNA in human first trimester trophoblast. *Hum Immunol* 59: 87-98

Hviid TV, Sorensen S, Morling N (1999) Polymorphism in the regulatory region located more than 1.1 kilobases 5' to the start site of transcription, the promoter region and exon 1 of the HLA-G gene. *Hum Immunol* 60: 1237-1244

Hviid TV, Hylenius S, Hoegh AM, Kruse C, Christiansen OB (2002) HLA-G polymorphisms in couples with spontaneous abortions. *Tissue antigens* 60: 122-132

Hviid TV, Hylenius S, Rorbye C, Nielsen LG (2003) HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics* 55: 63-79

Hviid TV, Hylenius S, Lindhard A, Christiansen OB (2004a) Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. *Tissue Antigens* 64: 66-69

Hviid TV, Rizzo R, Christiansen OB, Melchiorri L, Lindhard A, Baricordi OR (2004b) HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Immunogenetics* 56: 135-141

Hviid TV, Christiansen OB (2005) Linkage disequilibrium between human leukocyte antigen (HLA) class II and HLA-G – possible implications for human reproduction and autoimmune disease. *Hum Immunol* 66: 688-699

Hviid TV (2006) HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update* 12: 209-232

Hylenius S, Andersen AM, Melbye M, Hviid TV (2004) Association between HLA-G genotype and risk of pre-eclampsia: a case-control study using family triads. *Mol Hum Reprod* 10: 237-246

Ishitani A, Geraghty DE (1992) Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Nat Acad Sci* 89: 3947-3951

Ito T, Ito N, Saathoff M, Stampachiaccchiere B, Bettermann A, Bulfone-Paus S, Takigawa M, Nickoloff BJ, Paus R (2005) Immunology of the human nail apparatus: the nail matrix is a site of relative immune privilege. *J Invest Dermatol* 125: 1139-1148

Jenkins RE, Shornick JK, Black MM (1993) Pemphigoid gestationis. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 2: 163-173

- Jenkins RE, Vaughan Jones SA, Black MM (1995) Conversion of pemphigoid gestationis to bullous pemphigoid: Two refractory cases highlighting this association. *Br J Dermatol* 135: 595-598
- Jenkins RE, Hern S, Black MM (1999) Clinical features and management of 87 patients with pemphigoid gestationis. *Clin Exp Dermatol* 24: 255-259
- Jenkins RE, Shornick JK (2002) Pemphigoid (Herpes) gestationis. In: Black M, McKay M editors. *Obstetric and gynecologic dermatology*. 2<sup>nd</sup> edition, Elsevier, Oxford 29-37
- Kanai T, Fujii T, Unno N, Yamashita T, Hyodo H, Miki A, Hamai Y, Kozuma S, Taketani Y (2002) Human leukocyte antigen-G-expressing cells differently modulate the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua versus peripheral blood. *Am J Reprod Immunol* 45: 94-99
- Katz SI, Hertz KC, Yaoita H (1976) Herpes gestationis: immunopathology and characterization of the HG factor. *J Clin Invest* 57: 1434-1441
- Kaye MD (1987) Immunological aspects of gastritis and pernicious anaemia. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1: 487-506
- Kelly SE, Bhogal BS, Wojnarowska F, Black MM (1988) Expression of a pemphigoid gestationis-related antigen by human placenta *Br J Dermatol* 118: 605-611
- Khosrotehrani K, Le Danff C, Reynaud-Mendel B, Dubertret L, Carosella ED, Aractingi S (2001) HLA-G expression in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 117: 750-752
- King A, Burrows TD, Hiby SE, Bowen JM, Joseph S, Verma S, Lim PB, Gardner L, LeBouteiller P, Ziegler A, Uchanska-Ziegler B, Loke YW (2000) Surface Expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast. *Placenta* 21: 376-387
- Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R (1990) A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 248 : 220-223
- Kreuter A, Harati A, Breuckmann F, Appelhans C, Altmeyer P (2004) Intravenous immune globulin in the treatment of persistent pemphigoid gestationis. *J Am Acad Dermatol* 51: 1027-1028
- Lajoie J, Jeanneau A, Faucher MC, Moreau P, Roger M (2008) Characterisation of five novel HLA-G alleles with coding DNA base changes. *Tissue antigens* 72: 502-504
- Lawley TJ, Stingl G, Katz SI (1978) Fetal and maternal risk factors in herpes gestationis. *Arch Dermatol* 114: 552-555
- Le Bouteiller P, Mallet V (1997) HLA-G and pregnancy. *Rev Reprod* 2: 7-13
- Le Discorde M, Moreau P, Sabatier P, Legeais JM, Carosella ED (2003) Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Hum Immunol* 64: 1039-1044

- Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C, Khalil-Daher I, Menier C, Dausset J, Guillet JG, Carosella ED, Rouas-Freiss N (1999) HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 11: 1351-1356
- Le Maoult J, Krawice-Radanne I, Dausset J, Carosella ED (2004) HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci* 101: 7064-7069
- Lenfant F, Pizzato N, Liang S, Davrinche C, Le Bouteiller P, Horuzsko A (2003) Induction of HLA-G-restricted human cytomegalovirus pp65 (UL83)-specific cytotoxic T lymphocytes in HLA-G transgenic mice. *J Gen Virol* 84: 307-317
- Lila N, Carpentier A, Amrein C, Khalil-Daher I, Dausset J, Carosella ED (2000) Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet* 355: 2138
- Lin MS, Gharia M, Fu CL, Olague-Marchan M, Hacker M, Harman KE, Bhogal BS, Black MM, Diaz LA, Giudice GJ (1999) Molecular mapping of the major epitopes of BP180 recognized by herpes gestationis autoantibodies. *Clin Immunol* 92: 285-292
- Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, Giudice GJ (1993) A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest* 92: 2480-2488
- Llano M, Lee N, Navarro F, Garcia P, Albar JP, Geraghty DE, Lopez-Botet M (1998) HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *Eur J Immunol* 28: 2854-2863
- Maejima M, Fujii T, Kozuma S, Okai T, Shibata Y, Taketani Y (1997) Presence of HLA-G-expressing cells modulates the ability of peripheral blood mononuclear cells to release cytokines. *Am J Reprod Immunol* 38: 79-82
- Menier C, Riteau B, Carosella ED, Rouas-Freiss N (2002) MICA triggering signal for NK cell tumor lysis is counteracted by HLA-G1-mediated inhibitory signal. *Int J Cancer* 100: 63-70
- Messer G, Schirren H, Meurer M (1993) Herpes gestationis: immunological and immunogenetic aspects. *Hautarzt* 44: 761-766
- Messer G, Meurer M (2001) Diagnostic significance of autoantibodies in bullous dermatoses. *Dtsch Med Wochenschr* 126: 79-82
- Mobini N, Yunis EJ, Alper CA, Yunis JJ, Delgado JC, Yunis DE, Firooz A, Dowlati Y, Bahar K, Gregersen PK, Ahmed AR (1997) Identical MHC markers in non-Jewish Iranian and Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris: possible common central Asian ancestral origin. *Hum Immunol* 57: 62

Morales PJ, Pace JL, Platt JS, Phillips TA, Morgan K, Fazleabas AT, Hunt JS (2003) Placental cell expression of HLA-G2 isoforms is limited to the invasive trophoblast phenotype. *J Immunol* 171: 6215-6224

Moreau P, Paul P, Gourand L, Prost S, Dausset J, Carosella E, Kirszenbaum M (1997) HLA-G gene transcriptional regulation in trophoblasts and blood cells: differential binding of nuclear factors to a regulatory element located 1.1 kb from exon 1. *Hum Immunol* 52: 41-46

Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, Carosella ED, Paul P (1999) IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 11: 803-811

Morrison LH, Labib RS, Zone JJ, Diaz LA, Anhalt GJ (1988) Herpes gestationis autoantibodies recognize a 180-kD human epidermal antigen. *J Clin Invest* 81: 2023

National Center for Biotechnology Information (NCBI)  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=1704](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1704) (Stand: 23.12.2008)

Nicolae D, Cox NJ, Lester LA, Schneider D, Tan Z, Billstrand C, Kuldane S, Donfack J, Kogut P, Patel NM, Goodenbour J, Howard T, Wolf R, Koppelman GH, White SR, Parry R, Postma DS, Meyers D, Bleecker ER, Hunt JS, Solway J, Ober C (2005) Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. *Am J Hum Genet* 76: 349-357

Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, Biagiotti R, Pellegrini S, Menicucci A, Baricordi OR (2005) Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod* 20: 138-146

O'Brien M, McCarthy T, Jenkins D, Paul P, Dausset J, Carosella ED, Moreau P (2001) Altered HLA-G transcription in pre-eclampsia is associated with allele specific inheritance: possible role of the HLA-G gene in susceptibility to the disease. *Cell Mol Life Sci* 58: 1943-1949

Ober C, Rosinsky B, Grimsley C, van der Ven K, Robertson A, Runge A (1996) Population genetic studies of HLA-G: allele frequencies and linkage disequilibrium with HLA-A1. *J Reprod Immunol* 32: 111-123

Ober C, Aldrich CL, Chervoneva I, Billstrand C, Rahimov F, Gray HL, Hyslop T (2003) Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *Am J Hum Genet* 72: 1425-1435

Ober C, Billstrand C, Kuldane S, Tan Z (2006) The miscarriage-associated HLA-G -725G allele influences transcription rates in JEG-3 cells. *Hum Reprod* 21: 1743-1748

Ortonne JP, His BL, Verrando P, Bernerd F, Pautrat G, Pisani A, Yeh CJG (1987) Herpes gestationis factor reacts with the amniotic epithelial basement membrane. *Br J Dermatol* 117: 147-154

- Ostensen M, Husby G (1985) Antirheumatic drug treatment during pregnancy and lactation. *Scand J Rheumatology* 14: 1-7
- Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, et al. (1998) HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4510-4515
- Pfeiffer C (2001) Dermatologische Steroidtherapie in Schwangerschaft und Stillzeit. *Hautarzt* 52: 998-1002
- Pfeiffer KA, Rebmann V, Pässler M, van der Ven K, van der Ven H, Krebs D, Grosse-Wilde H (2000) Soluble HLA levels in early pregnancy after in vitro fertilization. *Hum Immunol* 61: 559-564
- Pfeiffer KA, Fimmers R, Engels G, van der Ven H, van der Ven K (2001) The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod* 7: 373-378
- Ponte M, Cantoni C, Biassoni R, Tradori-Cappai A, Bentivoglio G, Viale C, Bertone S, Moretta A, Moreta L, Mingari MC (1999) Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p94, an HLA-G1-specific receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5674-5679
- Powell AM, Sakuma-Oyama Y, Oyama N, Albert S, Bhogal B, Kaneko F, Nishikawa T, Black MM (2005a) Usefulness of BP 180 NC16a enzyme-linked immunosorbent assay in the serodiagnosis of pemphigoid gestationis and in differentiating between pemphigoid gestationis and pruritic urticarial papules and plaques of pregnancy. *Arch Dermatol* 141: 705-710
- Powell AM, Sakuma-Oyama Y, Oyama N, Black MM (2005b) Collagen XVII/BP180: a collagenous transmembrane protein and component of the dermoepidermal anchoring complex. *Clin Exp Dermatol* 30: 682-687
- Rajagopalan S, Long EO (1999) A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med* 189: 1093-1100
- Ramsey-Goldman R, Schilling E (1996) Optimum use of disease-modifying and immunosuppressive antirheumatic agents during pregnancy and lactation. *Clin Immunother* 5: 40-58
- Rebmann V, Pfeiffer K, Pässler M, Ferrone S, Maier S, Weiss E, Grosse-Wilde H (2001) Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid. *Tissue antigens* 53: 14-22
- Rebmann V, Busemann A, Lindemann M, Grosse-Wilde H (2003) Detection of HLA-G5 secreting cells. *Hum Immunol* 64: 1017-1024

- Rieger L, Hofmeister V, Probe C, Dietl J, Weiss EH, Steck T, Kämmerer U (2002) Th1- and Th2-like cytokine production by first trimester decidual large granular lymphocytes is influenced by HLA-G and HLA-E. *Mol Hum Reprod* 8: 255-261
- Riteau B, Rouas-Freiss N, Menier C, Paul P, Dausset J, Carosella ED (2001) HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. *J Immunol* 166: 5018-5026
- Rizzo R, Hviid TV, Stignani M, Balboni A, Grappa MT, Melchiorri L, Baricordi OR (2005) The HLA-G genotype is associated with IL-10 in activated PBMCs. *Immunogenetics* 57: 172-181
- Rizzo R, Hviid TV, Govoni M, Padovan M, Rubini M, Melchiorri L, Stignani M, Carturan S, Grappa MT, Fotindi M, Ferretti S, Voss A, Lastrup H, Junker P, Trotta F, Baricordi OR (2008) HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 71: 520-529
- Roger D, Vaillant L, Fignon A, et al (1994) Specific pruritic diseases of pregnancy. A prospective study of 3192 women. *Arch Dermatol* 130: 734-739
- Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Riteau B, Menier C, Paul P, Dausset J, Carosella ED (1999) The immunotolerance role of HLA-G. *Semin Cancer Biol* 9: 3-12
- Rouas-Freiss N, Moreau P, Ferrone S, Carosella ED (2005) HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res* 65: 10139-10144
- Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, Moreau P (2003) The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3'UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol* 64: 1005-1010
- Sadler TW (1998) *Medizinische Embryologie*. 9. Auflage, Thieme, Stuttgart 36-114
- Satoh S, Seishima M, Sawada Y, Izumi T, Yoneda K, Kitajima Y (1999) The time course of the change in antibody titres in herpes gestationis. *Br J Dermatol* 140: 119-123
- Schirren H, Messer G, Schirren CG, Meurer M (1993) Immunogenetic findings in herpes gestationis. *Hautarzt* 44: 767-771
- Schmidt CM, Ehlenfeldt RG, Athanasiou MC, Duvick LA, Heinrichs H, David CS, Orr HT (1993) Extraembryonic expression of the human MHC class I gene HLA-G in transgenic mice. Evidence for a positive regulatory region located 1 kilobase 5' to the start site of transcription. *J Immunol* 151: 2633-2645
- Shimanovich IA, Bröcker EB, Zillikens D (2002) Pemphigoid gestationis: new insights into the pathogenesis lead to novel diagnostic tools. *BJOG* 109: 970-976
- Shornick JK, Stastny P, Gilliam JN (1981) High frequency of histocompatibility antigens HLA-DR3 and DR4 in herpes gestationis. *J Clin Invest* 68: 553-555

- Shornick JK, Stastny P, Gilliam GN (1983a) Paternal histocompatibility (HLA) antigens and maternal anti-HLA antibodies in herpes gestationis. *J Invest Dermatol* 81: 407-409
- Shornick JK, Bangert JL, Freeman RG, Gilliam JN (1983b) Herpes gestationis: Clinical and histological features of twentyeight cases. *J An Acad Dermatol* 8: 241-244
- Shornick JK, Meek TJ, Nesbit LT Jr, Gilliam JN (1984) Herpes gestationis in blacks. *Arch Dermatol* 120: 511-513
- Shornick JK (1987) Herpes gestationis. *J am Acad Dermatol* 17: 539
- Shornick JK, Black MM (1992a) Fetal risks in herpes gestationis. *J Am Acad Dermatol* 26: 63-68
- Shornick JK, Black MM (1992b) Secondary autoimmune disease in herpes gestationis. *J Am Acad Dermatol* 26: 563-566
- Shornick JK, Artlett CM, Jenkins RE, Briggs DC, Welsh KI, Garvey MP et al (1993) Complement polymorphisms in herpes gestationis: association with C4 null allele. *J Am Acad Dermatol* 29: 545-549
- Soderhall C, Bradley M, Kockum I, Wahlgren CF, Luthman H, Nordenskjold M (2001) Linkage and association to candidate regions in Swedish atopic dermatitis families. *Hum Genet* 109: 129-135
- Solier C, Mallet V, Lenfant F, Bertrand A, Huchenaq A, Le Bouteiller P (2001) HLA-G unique promotor region: functional implications. *Immunogenetics* 53: 617-625
- Speroff L, Glass RH, Kase NG (1999) The endocrinology of pregnancy. In: Speroff L, Glass RH, Kase NG editors. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 6th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore 275-335
- Stites DP, Siiteri PK (1983) Steroids as immunosuppressants in pregnancy. *Immunol Rev* 117-138
- Tan CY, Ho JF, Chong YS, Loganath A, Chan YH, Ravichandran J, LeeCG, Chong SS (2008) Paternal contribution of HLA-G\*0106 significantly increases risk for pre-eclampsia in multigravid pregnancies. *Mol Hum Reprod* 14: 317-324
- Tan Z, Shon AM, Ober C (2005) Evidence of balancing selection at the HLA-G promotor region. *Hum Mol Genet* 14: 3619-3628
- Tillman WG (1950) Herpes gestationis with hydatidiform mole and chorion epithelioma. *Br Med J* 1:1471
- Tindall JG, Rea TH, Shulman I, Quismorio FP (1981) Herpes gestationis in association with a hydatidiform mole. *Arch Dermatol* 117: 510-512



- Tiwari JI, Terasaki PI (1985) HLA and disease associations. Springer, Heidelberg
- Torres MI, Le Discorde M, Lorite P, Rios A, Gassull MA, Maldonado J, Dausset J, Carosella ED (2004) Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int Immunol* 16: 579-583
- Ulbrecht M, Rehberger B, Strobel I, Messer G, Kind P, Degitz K, Bieber T, Weiss EH (1994) HLA-G: expression in human keratinocytes in vitro and in human skin in vivo. *Eur J Immunol* 24: 176-180
- Wöhrl S, Geusau A, Karlhofer F, Derfler K, Stingl G, Zillikens D (2003) Pemphigoid gestationis: treatment with immunoapheresis. *J Dtsch Dermatol Ges* 1: 126-130
- Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, Wischhusen J, Bornemann A, Meyermann R, Weiss EH, Melms A, Weller M (2002) A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol* 168: 4772-4780
- Yamamoto K, Inoue N, Masuda R, Fujimori A, Saito T, Imajoh-Ohmi S, Shinkai H, Sakiyama H (2002) Cloning of hamster type XVII collagen cDNA, and pathogenesis of anti-type XVII collagen antibody and complement in hamster bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 118: 485-492
- Yie SM, Balakier H, Motamedi G, Librach CL (2005) Secretion of human leukocyte antigen-G by human embryos is associated with a higher in vitro fertilization pregnancy rate. *Fertil Steril* 83: 30-36
- Yie SM, Li LH, Li GM, Xiao R, Librach CL (2006a) Progesterone enhances HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts in vitro. *Hum Reprod* 21: 46-51
- Yie SM, Xiao R, Librach CL (2006b) Progesterone regulates HLA-G expression through a novel progesterone response element. *Hum Reprod* 21: 2538-2544
- Yie SM, Li LH, Xiao R, Librach CL (2008) A single base-pair mutation in the 3' untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 14: 649-653
- Yip L, Mc Cluskey J, Sinclair R (2006) Immunological aspects of pregnancy. *Clinics in Dermatology* 24: 84-87
- Zhang XJ, He PP, Wang ZX, Zhang J, Li YB, Wang HY, Wei SC, Chen SY, Xu SJ, Jin L, Yang S, Huang W (2002) Evidence for a major psoriasis susceptibility locus at 6p21(PSORS1) and a novel candidate region at 4q31 by genome-wide scan in Chinese Hans. *J Invest Dermatol* 119: 1361-1366
- Zillikens, D (1999) Acquired skin disease of hemidesmosomes. *J Dermatol Sci* 20: 134-154

Zillikens, D (2005) Pemphigoid gestationis. In: Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M Hrsg. Dermatologie und Venerologie. 5. Auflage, Springer, Heidelberg 624-626

## 9. Anhang

### 9.1 Patientenkollektiv

DNA	-1306	-964	-762	-725	indel14
P1	GG	GG	CC	GG	DD
P2	GA	GA	CT	CC	II
P3	GA	GA	CT	CC	DD
P4	AA	AA	TT	CC	II
P5	GA	GA	CT	CC	ID
P6	AA	AA	TT	CC	II
P7*	GA	AA	TT	CC	II
P8	GG	GG	CC	CT	ID
P9	GG	GG	CC	CG	DD
P10*	GG	GA	-	CC	DD
P11	GA	GA	CT	CT	II
P12	GA	GA	CT	CC	ID
P13	GA	GA	CT	CC	ID
P14	GA	GA	CT	CC	ID
P15	GA	GA	CT	CG	ID
P16	AA	AA	TT	CC	II
P17*	GG	GA	CT	CC	ID
P18	AA	AA	TT	CC	II
V1	GG	GG	CC	CC	DD
V2	GG	GG	CC	CC	DD
V4	GG	GG	CC	CG	DD
V5	GA	GA	CT	CC	ID
V6	GA	GA	CT	CC	ID
V7	AA	AA	TT	CC	ID
V9	GG	GG	CC	CG	DD
V11	GG	GG	CC	CC	DD
V13	AA	AA	TT	CC	II
V16	GG	GG	CC	CG	DD
V17	GA	GA	CT	CG	ID
V18	GA	GA	CT	CC	ID
V19	GA	GA	CT	CC	-
K4a	GA	GA	CT	CC	ID
K4b	GA	GA	CT	CG	ID
K4c	GA	GA	CT	CG	ID
K11a	GG	GG	CC	CT	ID
K11b	GA	GA	CT	CC	ID
K11c	GA	GA	TC	CC	ID
K13a	GA	GA	TC	CC	ID
K13b	AA	AA	TT	CC	II
K17	GG	GG	CC	CG	DD

Tabelle 18: Patientenkollektiv. Aufgelistet sind die Ergebnisse der Typisierung der Pemphigoid-gestationis-Patientinnen (P), Väter (V) und Kinder (K) bezüglich der aufgeführten Polymorphismen. Bei den mit \* markierten Individuen war das Kopplungsungleichgewicht an den Positionen -1306, -964 und -762 möglicherweise aufgehoben.

## 9.2 Kontrollkollektiv

DNA	-1306	-964	-762	-725	indel14
N1	GG	GG	CC	CG	-
N2*	GA	GA	CT	CG	-
N3	GG	GG	CC	GT	-
N4	GA	GA	CT	CC	-
N5	AA	AA	TT	CC	II
N6*	AA	AA	TT	CC	-
N7	GG	GG	CC	GG	-
N8	GG	GG	CC	CC	DD
N9	GA	GA	CT	CC	DD
N10	AA	AA	TT	CC	-
N11	GA	GA	CT	CG	ID
N12	GA	GA	CT	CC	ID
N13	AA	AA	TT	CC	II
N14	GG	GG	CC	CC	-
N15	GA	GA	CT	CC	DD
N16	GA	GA	CT	CC	DD
N17	GA	GA	CT	CG	ID
N18	AA	AA	TT	CC	II
N20	AA	AA	TT	CC	ID
N21	AA	AA	TT	CC	ID
N23	AA	AA	TT	CC	ID
N25	AA	AA	TT	CC	II
N27	GA	GA	CT	CC	ID
N28	GA	GA	CT	CC	ID
N29	GA	GA	CT	CC	ID
N30	GA	GA	CT	CC	DD
N39	GA	GA	CT	CC	ID
N41	GG	GG	CC	CC	DD
N42	GA	GA	CT	CC	ID
N49	GA	GA	-	CC	ID
N51	GG	GG	CC	CC	DD
N53	GA	GA	CT	CC	ID
N55	AA	AA	TT	CC	II
N56	AA	AA	TT	CC	II
N63	AA	AA	TT	CC	II
N68	GA	GA	CT	CC	ID
N69	GG	GG	CC	CG	DD
N73	GG	GG	-	CC	DD
N74	AA	AA	TT	CC	ID
N75	GA	GA	CT	CC	-
N77	GA	GA	CT	CC	ID

N78	AA	AA	TT	CC	II
N80	GA	GA	CT	CC	ID
N82	AA	AA	TT	CC	II
N90	GA	-	CT	CC	ID
N97	GA	GA	CT	CC	DD
N103	AA	AA	TT	CC	DD
N104	GA	GA	CT	-	-
N105	GG	GG	CC	CC	DD
N106	AA	AA	TT	CC	II
N114	AA	AA	TT	CC	II
N120	GA	GA	CT	CC	DD
N125	GA	GA	CT	CC	ID
N126	GA	GA	CT	CC	ID

Tabelle 19: Kontrollkollektiv. Aufgelistet sind die Ergebnisse der Typisierung der Kontrollindividuen (N). Die mit \* markierten Individuen wurden aufgrund ihres männlichen Geschlechts nachträglich aus dem Kontrollkollektiv entfernt und wurden in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

## Danksagung

Herrn Privatdozent Dr. med. G. Messer, meinem Doktorvater, danke ich für die freundliche Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die geduldige Unterstützung und das stete Interesse am Erfolg dieses Projektes.

Mein ganz besonderer Dank gebührt Frau Professor Dr. E. H. Weiss vom Department Biologie II der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Möglichkeit, in ihrer Abteilung Experimente durchführen zu können. Durch ihre freundliche, fördernde und motivierende Betreuung in allen Phasen der Dissertation und ihre aufschlussreiche Beratung bei allen Fragestellungen gab sie mir Ihre volle Unterstützung.

Herrn Dr. med. J. Glas möchte ich ganz besonders danken für die Möglichkeit, im Forschungslabor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie Experimente durchführen zu können. Für die hervorragende Beratung bei der Planung und Durchführung der Experimente, sowie für die Hilfe bei der statistischen Auswertung und in der Korrekturphase der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. G. Plewig und Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka danke ich für die Möglichkeit an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München meine Dissertation anfertigen zu dürfen.