

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der
Ludwig Maximilians Universität zu München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. T. Ruzicka

Immungenetische Untersuchungen zur Assoziation von Polymorphismen im
klassischen Hauptkompatibilitätskomplex (MHC) der Klasse I- und II- Gene mit
der schwangerschaftsassozierten Autoimmundermatose Pemphigoid gestationis

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Myrthe Magdalena Eckart
aus Starnberg

2010

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. med. Gerald Messer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Rudolf Gruber
Prof. Dr. Ludger Klein

Mitbetreuung durch: Dr. rer. biol. hum. Elisabeth Keller
Prof. Dr. Dr. Elisabeth Weiß

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.2010

*Gewidmet meiner Großmutter Ágnes Batthyány-Eggenhofer,
die aufgrund politischer Verfolgung im Nachkriegs-Ungarn
ihre Promotion nie abschließen durfte.*

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Pemphigoid gestationis - eine schwangerschaftsassozierte Autoimmundermatose	1
1.1.1	Allgemeine Angaben zu dem Krankheitsbild Pemphigoid gestationis	1
1.1.2	Epidemiologie und Klinik des Krankheitsbildes Pemphigoid gestationis.....	1
1.1.3	Diagnostik und Therapie des Pemphigoid gestationis.....	3
1.1.4	Fetales Risiko bei Pemphigoid gestationis	5
1.2	Angaben zur Ätiopathogenese des Pemphigoid gestationis	6
1.2.1	Das Autoantigen BP180 /Kollagen XVII	6
1.2.2	Schwangerschaft und Trophoblastentumore- Auslöser des Pemphigoid gestationis	8
1.3	Assoziation des Pemphigoid gestationis mit Allelen des HLA-Systems.....	13
1.3.1	Aufbau und Funktion des HLA-System	13
1.3.2	Genetische Befunde bei der Erkrankung des Pemphigoid gestationis	20
1.3.3	Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen	21
2.	Zielsetzung.....	22
3.	Material.....	23
3.1	Studienkollektiv	23
3.1.1	Patientenkollektiv	23
3.1.2	Kontrollkollektiv	23
3.2	Kits und Chemikalien	24
3.2.1	Material für die DNA-Isolierung	24
3.2.2	Materialien für die Polymerasekettenreaktion.....	24
3.2.3	Material für die Agarosegelelektrophorese	25
3.2.4	Materialien für Amplifikat-Reinigung.....	25
3.2.5	Materialien für die Sequenzier-Polymerasekettenreaktion.....	26
3.2.6	Materialien für die Reinigung der Sequenzierreaktion.....	26
3.3	Oligonukleotide.....	27
3.3.1	Amplifikationsprimer	28
3.3.2	Sequenzierprimer.....	29
3.4	Geräte	30
4.	Methoden.....	31
4.1	Allgemeine Vorgehensweise.....	31

4.2	Molekularbiologische Methoden	31
4.2.1	Isolierung genomischer DNA	31
4.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	32
4.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)-Amplifikation der Genabschnitte	32
4.2.4	Kontrolle der Amplifikation mittels Agarosegelelektrophorese	34
4.2.5	Reinigung der Amplifikate	36
4.2.6	Sequenzier-Polymerasekettenreaktion (Cycle-Sequencing).....	36
4.2.7	Reinigung des Sequenzieransatzes mit Clean-Seq Beads	37
4.2.8	Sequenzierung mithilfe des ABI 3130xl Genetic Analyzer	38
4.3	Statistische Auswertung.....	39
5.	Ergebnisse.....	40
5.1	Ergebnisse der HLA-Kompletttypisierung	40
5.2	Analyse der Aminosäuresequenzen typisierter HLA-Gene bei Pemphigoid gestationis Patientinnen und deren Kinder	49
5.3	Einteilung der HLA-B und C-Allele nach KIR-bindenden Epitopen.....	54
5.4	Familienstammbäume vollständiger Familien	58
6.	Diskussion	64
7.	Zusammenfassung	71
8.	Anhang.....	73
8.1	Typisierungsdaten	73
8.2	Aminosäuresequenzen der typisierten HLA-Klasse-I und HLA-Klasse-II-Loci der Pemphigoid gestationis Patientinnen	76
8.3	Referenzen	83
8.4	Danksagung.....	95

1. Einleitung

1.1 Pemphigoid gestationis - eine schwangerschaftsassozierte Autoimmundermatose

1.1.1 Allgemeine Angaben zu dem Krankheitsbild Pemphigoid gestationis

Bei dem Krankheitsbild Pemphigoid gestationis handelt es sich um eine sehr seltene selbstlimitierende, bullöse Autoimmundermatose unbekannter Ätiologie, die während der Schwangerschaft oder unmittelbar postpartal auftritt (Holmes and Black 1982; Lin, Arteaga et al. 2001; Nanda, Al-Saeed et al. 2003). Sie wurde auch in wenigen Fällen im Rahmen von schwangerschaftsassozierten Trophoblastentumoren beschrieben (Tindall, Rea et al. 1981; do Valle Chiossi, Costa et al. 2000). Was den Namen der Erkrankung betrifft, sind viele historische Bezeichnungen bekannt. Die bis heute gebräuchliche Bezeichnung Herpes gestationis geht auf den englischen Dermatologen John Laws Milton in das Jahr 1872 zurück (Shornick 1987; Jenkins, Shornick et al. 1993). Der Begriff Pemphigoid gestationis, der auf die klinischen und immunpathologischen Ähnlichkeiten mit den bullösen Pemphigoid-Erkrankungen hinweist, wurde 1982 von Holmes und Black geprägt (Holmes and Black 1982). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird dieser neuere Krankheitsname Pemphigoid gestationis (PG) verwendet.

1.1.2 Epidemiologie und Klinik des Krankheitsbildes Pemphigoid gestationis

Die Inzidenz der Erkrankung ist in der Literatur mit ca. 1: 10 000- 50 000 Schwangerschaften angegeben (Holmes, Black et al. 1982; Ambros-Rudolph, Müllegger et al. 2006; Cianchini, Masini et al. 2007). Das PG manifestiert sich typischerweise in der Spätschwangerschaft; zu etwa 18% im ersten, zu 34% im zweiten, zu weiteren 34% im dritten Trimenon und zu etwa 13% in der Postpartalperiode (Jenkins, Hern et al. 1999). Beim Auftreten im zweiten Trimenon kommt es häufig in den letzten Wochen der Schwangerschaft zu einer relativen Remission, um dann postpartal zu exazerbieren (sog. postapartaler „flare up“) (Shornick 1987; Shimanovich, Brocker et al. 2002).

In nachfolgenden Schwangerschaften aller Erkrankten manifestiert sich die Erkrankung meist früher und zeigt häufig einen schwereren Verlauf (Shornick, Bangert et al. 1983; Yancey

1990; Schirren, Messer et al. 1993). Bei Multiparae manifestiert sich das PG nicht zwingend in jeder Schwangerschaft. Es sind rezidivfreie Schwangerschaften sog. „skip pregnancies“ möglich, deren Auftreten, aber nicht vorhersehbar zu sein scheint (Holmes, Black et al. 1983; Ibbotson and Lawrence 1995; Jenkins, Hern et al. 1999; Shimanovich, Brocker et al. 2002). Das klinische Erscheinungsbild des PG ist durch heftigen Juckreiz gekennzeichnet, der in der Regel dem Auftreten von urtikariellen Erythemen, Papeln und Plaques vorausgeht (Sitaru, Powell et al. 2004). Die Hautveränderungen manifestieren sich typischerweise im Bereich des Abdomens unter Einbeziehung der Periumbilikal-Region und breiten sich anschließend auf Oberschenkel, Handflächen und Fußsohlen aus (Shimanovich, Brocker et al. 2002; Ambros-Rudolph 2008). Das Gesicht und die Mundschleimhäute bleiben meist ausgespart (Shornick, Bangert et al. 1983). Die Blasen, die erst im weiteren Krankheitsverlauf entstehen, hinterlassen oft ausgedehnte Erosionen (Ambros-Rudolph 2008). Die Blasenbildung kann aber auch im gesamten Verlauf der Erkrankung ausbleiben (Shornick, Bangert et al. 1983; Ogilvie, Trautmann et al. 2000). Wenn es zu keiner sekundären Infektion kommt, heilen die Hautveränderungen innerhalb von ca. 3 Monaten nach der Geburt aus (Hanneken, Hodzic-Avdagic et al. 2005). Sehr selten kann die Erkrankung über Monate oder sogar Jahre persistieren (Holmes, Williamson et al. 1986; Jenkins, Jones et al. 1996; Amato, Mei et al. 2003; Kreuter, Harati et al. 2004; Cianchini, Masini et al. 2007).



Abbildung 1.1-1-Erythematöse, urtikarielle Plaques mit vereinzelt erodierten Blasen am rechten Fuß.



Abbildung 1.1-2-erythematöse, urtikarielle Plaques mit periumbilikaler Lokalisation

1.1.3 Diagnostik und Therapie des Pemphigoid gestationis

Zur Sicherung der Diagnose PG werden der klinische Verlauf, das Auftreten während oder nach einer Schwangerschaft, die histologische Untersuchung einer Hautbiopsie, indirekte und direkte Immunfluoreszenz-Techniken sowie immunserologische Verfahren (ELISA und Immunoblot) herangezogen (Messer and Meurer 2001; Hertl 2009).

Die pathohistologischen Befunde variieren je nach klinischem Bild. Es finden sich neben epidermaler Spongiose ein dermales Ödem und ein perivaskuläres lymphohistiozytäres Infiltrat mit Gewebseosinophilie. Im bullösen Stadium ist eine subepidermale Spaltbildung charakteristisch (Shimanovich, Brocker et al. 2002; Ambros-Rudolph 2008).

Mittels direkter Immunfluoreszenz kann in nahezu 100% der Fälle die lineare Ablagerung des Komplementfaktors C3 entlang der Basalmembranzone (BZM) nachgewiesen werden (Honeyman, Eguiguren et al. 1981; Holmes and Black 1983; Shornick, Bangert et al. 1983; Fabbri, Caproni et al. 2003). In etwa 30% kann zusätzlich eine begleitende IgG-Ablagerung entlang der dermo-epidermalen Junktionszone gezeigt werden. Seltener werden IgA-, IgM-, C1-, C4 und C5-Ablagerungen in gleicher Lokalisation gesehen (Chimanovitch, Brocker et al. 2001).

Mit der konventionellen indirekten Immunfluoreszenz-Technik auf NaCl-separierter humaner Spalthaut lassen sich in ca. 30% der Fälle zirkulierende IgG-Autoantikörper nachweisen. Wird in einem Mehrschrittverfahren zusätzlich mit einer Komplementquelle inkubiert, kann bei über 90% der Betroffenen ein komplementfixierendes IgG, das gegen das bullöse Pemphigoidantigen 2 der kutanen Basalmembranzone (BZM) gerichtet ist, erfasst werden. Immunserologische Verfahren wie ELISA und Immunoblot mit rekombinantem BP180 stellen weitere diagnostische Hilfsmittel mit hoher Spezifität und Sensitivität dar, sie werden unter anderem in der Differenzialdiagnostik bei unklaren Fällen herangezogen.

Da die mit ELISA gemessene Antikörper-Konzentration meist mit der Krankheitsaktivität korreliert, stellt sie einen wichtigen Verlaufsparemeter dar (Sitaru, Powell et al. 2004; Aoyama, Asai et al. 2007; Cianchini, Masini et al. 2007).

Differentialdiagnostisch muss das PG von juckenden Papeln und Plaques in der Schwangerschaft (PUPP) abgegrenzt werden, diese entsprechen histologisch sowie in der direkten Immunfluoreszenz dem PG (Shornick, Stastny et al. 1981; Yancey 1990; Schirren, Messer et al. 1993).

Das klinische Erscheinungsbild ähnelt dem des PG, wobei die Blasenbildung fehlt (Holmes, Black et al. 1982). Die Erkrankung PUPP tritt meist im dritten Trimenon der ersten Schwangerschaft auf, ist insgesamt häufiger als das PG und heilt nach der Entbindung ab, wohingegen das PG in der Regel im zweiten oder dritten Trimenon beginnt, in der Spätschwangerschaft einen milderen Verlauf zeigt und nach der Entbindung exazerbiert (Mayou, Black et al. 1988). Histologisch lässt sich das erythemato-urtikarielle Frühstadium eines PG oft nicht von PUPP unterscheiden (Mayou, Black et al. 1988).

Ziel der Therapie ist die Kontrolle des starken Juckreizes und die Unterdrückung der Blasenbildung. Bei moderater Ausprägung ist die Behandlung mit topischen Kortikosteroiden in Kombination mit oralen Antihistaminika meist ausreichend (Shimanovich, Brocker et al. 2002). Bei schwereren therapieresistenten Fällen ist eine Gabe von Glukokortikosteroiden (0,5-1 mg Prednisolon/kg KG/Tag) erforderlich, wobei die Dosis dem Krankheitsverlauf entsprechend reduziert wird (Hertl and Schuler 2002; Hanneken, Hodzic-Avdagic et al. 2005). Um eine postpartale Exazerbation zu verhindern, ist eine Dosiserhöhung um den Zeitpunkt der Geburt notwendig. Obwohl die systemische Gabe von Prednisolon die fetale Prognose nicht zu beeinträchtigen scheint, ist eine spezifische sonographische Überwachung des fetalen Wachstums notwendig. Als weitere Komplikationen einer systemischen Prednisolontherapie können bei der Mutter Diabetes mellitus, Osteoporose oder Hypertonie auftreten (Holmes and Black 1984; Shornick and Black 1992; Jenkins, Shornick et al. 1993).

Laut den Empfehlungen der American Academy of Pediatrics (1994) ist das Stillen während der Einnahme von Prednison und Prednisolon grundsätzlich möglich, obwohl diese in geringen Mengen in die Muttermilch übergehen. Es sollte aber ein Abstand von mindestens 4 Stunden zwischen Medikamenteneinnahme und Stillen eingehalten werden, um eine möglichst geringe Steroidbelastung des Säuglings zu erzielen (Ostensen and Husby 1985).

Postpartal können zur Reduktion der Glukokortikoiddosis vorübergehend zytotoxische Immunsuppressiva (z.B. Dapson, Azathioprin, Cyclosporin, Cyclophosphamid) eingesetzt werden (Amato, Coronella et al. 2002; Hertl and Schuler 2002; Boulinguez, Bedane et al. 2003; Wohrl, Geusau et al. 2003).

In einem 2007 publizierten Patientenfall wurde über den therapeutischen Einsatz von Rituximab bei einem Fall von chronischem Pemphigoid gestationis berichtet, wobei eine Langzeitremission erzielt werden konnte (Cianchini, Masini et al. 2007).

Darüberhinaus gibt es Berichte über die erfolgreiche Behandlung des PG mit Immunglobulinen und Immunaphrese zur Entfernung der BP180-Autoantikörper aus den

Seren der Patienten (Jolles 2001; Wohrl, Geusau et al. 2003; Hanneken, Hodzic-Avdagic et al. 2005).

1.1.4 Fetales Risiko bei Pemphigoid gestationis

Da der PG-Autoantikörper plazentagängig ist, können bei 5-10% der Neugeborenen von Müttern mit PG erythemathöse, papulöse und selten bullöse Hautveränderungen auftreten (Shornick, Bangert et al. 1983; Chimanovitch, Brocker et al. 2001). Diese heilen innerhalb der ersten Lebenstage oder –Wochen spontan ab, da der passiv übertragene Autoantikörper abgebaut wird (Chimanovitch, Brocker et al. 2001). In den meisten Fällen werden die Immunglobuline in der Plazenta absorbiert und an der plazentaren Basalmembran abgelagert, was den Übertritt in den fetalen Kreislauf erschweren kann (Kelly and Black 1989).

Eine 1978 veröffentlichte retrospektive Untersuchung, die sich hauptsächlich auf Fallberichte stützte, fand eine Assoziation des PG mit einem erhöhten Risiko von Früh- und Totgeburten sowie spontanen Aborten (Lawley, Stingl et al. 1978). Spätere Studien konnten dies nicht bestätigen. Sie wiesen jedoch darauf hin, dass das PG durch die IgG-Ablagerung in der Plazenta die Entwicklung einer leichten Plazentainsuffizienz begünstigt und zur erhöhten Inzidenz von „small-for-date“ und „low-birthweight“- Kindern führt (Holmes, Black et al. 1982; Shornick, Bangert et al. 1983; Mascaro, Lecha et al. 1995).

Daneben scheint das PG eine Frühgeburt zu begünstigen (Lawley, Stingl et al. 1978; Holmes, Black et al. 1982; Holmes and Black 1984; Shornick and Black 1992; Mascaro, Lecha et al. 1995). Eine längere hochdosierte Kortikosteroidanwendung bei der Mutter kann eine Nebenniereninsuffizienz des Neugeborenen induzieren, die durch den Pädiater ausgeschlossen bzw. überwacht werden muss (Chimanovitch, Brocker et al. 2001).

1.2 Angaben zur Ätiopathogenese des Pemphigoid gestationis

Der Großteil der Pathomechanismen, die zum Krankheitsbild Pemphigoid gestationis führen, ist immer noch unbekannt.

Pathogenetisch spielen Komplement-fixierende Autoantikörper der Subklasse IgG1 und IgG3, die gegen Bestandteile der Hemidesmosomen in der oberen Lamina lucida der kutanen Basalzell-Membran-Zone (BMZ) gerichtet sind, eine wesentliche Rolle (Chimanovitch, Schmidt et al. 1999; Shimanovich, Brocker et al. 2002). Die Antikörper-Bindung führt zu einer Komplementaktivierung, der Einwanderung von Entzündungszellen und schließlich zur subepidermalen Blasenbildung (Schmidt and Zillikens 2000; Shimanovich, Brocker et al. 2002).

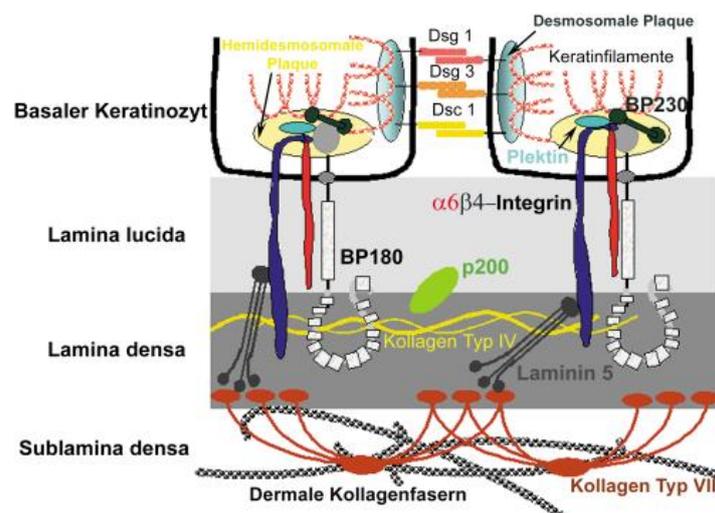


Abbildung 1.2-1-Schematische Darstellung der dermo-epidermalen Junctionszone

Die Desmosomen vermitteln die Verankerung der Keratinozyten innerhalb der Epidermis. Sie bestehen aus der intrazellulären desmosomalen Plaque (Desmogleine (Dsg) und Desmocolline (Dsc)), über deren extrazelluläre Anteile zwei Keratinozyten verbunden sind. Hemidesmosomen verankern die Keratinozyten auf der Basalmembran. Sie bestehen aus der hemidesmosomalen Plaque (BP230, Plektin) und transmembranösen Strukturproteinen (BP180, $\alpha6\beta4$ -Integrin), die über weitere Strukturproteine wie Laminin 5 Kontakt zu Verankerungsfibrillen (Typ VII-Kollagen) haben. Angelehnt an (Cassian, Matthias et al. 2004)

1.2.1 Das Autoantigen BP180 /Kollagen XVII

Das Autoantigen, gegen das die PG-Antikörper gerichtet sind, ist das 180-kD schwere bullöse Pemphigoid Antigen 2 (BP180) (Morrison, Labib et al. 1988; Giudice, Emery et al. 1993). Synonym wird die Bezeichnung Typ XVII Kollagen verwendet. Dem BP180, ein

transmembranöses Adhäsionsmolekül, kommt als Strukturelement der Hemidesmosomen eine wichtige Rolle bei der Verankerung der Keratinozyten auf der BMZ zu.

Da BP180 ein transmembranöses Glykoprotein mit Typ II-Orientierung ist, unterscheidet man den zytosolischen NH₂-Terminus von dem extrazellulären COOH-Terminus (Hopkinson, Riddelle et al. 1992; Franzke, Bruckner et al. 2005). Seine extrazelluläre Domäne setzt sich aus 15 kollagenen und 16 nicht-kollagenen, im Wechsel aufeinander folgenden Domänen zusammen (Giudice, Emery et al. 1992; Zillikens and Giudice 1999).

Eine besondere Bedeutung als Antigen-Determinante hat die sechzehnte nicht-kollagene Domäne (NC16A), die sich extrazellulär an der Zellmembran der basalen Keratinozyten befindet (Engineer, Bhol et al. 2000; Huilaja, Hurskainen et al. 2008).

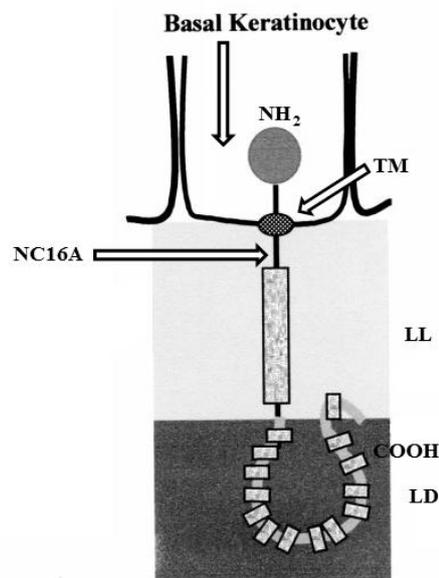


Abbildung 1.2-2-Schematische Abbildung des humanen BP180

Die zytosolische Domäne des BP180 ist in dem basalen Keratinozyten dargestellt. Die transmembranöse Region ist mit der Bezeichnung TM gekennzeichnet. Die extrazelluläre Domäne besteht aus 15 unterbrochenen kollagenen Domänen (helle Rechtecke), die einen zentralen Stab bilden, der die Lamina lucida (LL) spannt. Die 16. nicht-kollagene Domäne (NC16A) schließt sich extrazellulär direkt an die transmembranöse Domäne an. Das flexible Carboxyl-Ende des BP180 ragt bis zur Grenzfläche der LL und Lamina densa (LD). Angelehnt an (Sitaru, Schmidt et al. 2002)

Verschiedenen Untersuchungsergebnissen zur Folge scheint die Reaktivität der PG Antikörper auf die NC16A Domäne des BP180 begrenzt zu sein (Lin, Gharia et al. 1999; Perriard, Jaunin et al. 1999; C. Sitaru 2003). So hebt die Inkubation mit rekombinanter NC16A-Domäne (Glutathion-S-Transferase (GST)-NC16A) die Bindung der PG-Seren an die extrazelluläre Domäne (EZD) des BP180 auf (Lin, Gharia et al. 1999; C. Sitaru 2003).

Untersuchungsergebnisse von Sitaru et al. zeigten jedoch, dass es zusätzliche BP180-Epitope geben muss. Einzelne PG-Seren reagierten unter Testbedingungen des Immunblottings mit BP180 positiv, während dieselben Seren mittels ELISA-Verfahren als NC16A negativ bestimmt wurden (Sitaru, Powell et al. 2004).

Di Zenzo et al. konnten mittels Immunscreening und ELISA neben der NC16A-Domäne weitere Epitope des BP180-Moleküls in der intrazellulären als auch extrazellulären Domäne, die von PG-Antikörpern erkannt werden, nachweisen (Di Zenzo, Calabresi et al. 2007).

Antigenkartierung des humanen BP180 gab darüber Aufschluss, dass die NC16A-Domäne viele Hauptepitope, die mit T- und B-Zellen von BP- und PG-Patienten interagieren, beinhaltet (Giudice, Emery et al. 1993; Zillikens, Rose et al. 1997; Budinger, Borradori et al. 1998; Lin, Gharia et al. 1999; C. Sitaru 2003; Sitaru, Powell et al. 2004; Thoma-Uszynski, Uter et al. 2006).

Neben dem Expressionsort Haut wird BP180 in der Plazenta in extravillösen Zytotrophoblasten, in dem villösen Synzytium des Zottenepithels und den invasiven Intermediärzytotrophoblasten bereits im ersten Schwangerschaftstrimenon exprimiert. In Zellen der Nabelschnur, der Mundschleimhaut, des Ösophagus (Fairley, Heintz et al. 1995) und des Amnions ist BP180 ebenfalls nachweisbar (Engineer, Bhol et al. 2000; Oyama, Bhogal et al. 2003; Huilaja, Hurskainen et al. 2008).

1.2.2 Schwangerschaft und Trophoblastentumore- Auslöser des Pemphigoid gestationis

Da viele Autoren vermuten, dass bei der Initiation der Autoimmunreaktion, die zu dem Krankheitsbild PG führt, Plazentaantigene maßgeblich beteiligt sind (Ortonne, Hsi et al. 1987; Kelly, Black et al. 1990; Rachel E. Jenkins 2002; Shimanovich, Brocker et al. 2002), wird im Folgenden ein kurzer Überblick über die Strukturen und Aufgaben der Plazenta gegeben, die für das Verständnis der vorliegenden Arbeit relevant sind (Jenkins, Shornick et al. 1993; Le Bouteiller and Mallet 1997; Sadler 1998; Hunt, Petroff et al. 2005; Moffett and Loke 2006; Schulze 2006).

Schon am 4. Tag nach der Befruchtung der Eizelle existieren innerhalb der Blastozyste zwei Zelltypen, die Embryoblasten und Trophoblasten.

Während sich aus den Embryoblasten Embryo, Nabelschnur und Strukturen der Dottersackmembran entwickeln, heftet sich der Trophoblast an das Uterusepithel und wächst

in dieses zur Bildung der Plazenta ein. Sobald die Trophoblasten in der Uterusschleimhaut zum Liegen gekommen sind, beginnen sie dort ihr invasives Wachstum. Die Trophoblasten differenzieren sich dabei in villöse und extravillöse Synzytiotrophoblasten und Zytotrophoblasten.

Villöse Trophoblasten bedecken die später entstehenden Zottenbäumchen mit einer inneren Zytotrophoblastenschicht und einem darüberliegenden Synzytium, das in Kontakt mit dem mütterlichen Blut des intervillösen Raumes steht. Das villöse Synzytium ist speziell für die Synthese von Hormonen (z.B. humanes Choriongonadotropin HCG) sowie für Transportvorgänge von Gasen und Nährstoffen aus dem mütterlichen Blut in die Kapillaren der Plazenta-Zotten verantwortlich.

Extravillöse Trophoblasten, zu denen endovaskuläre, interstitielle Trophoblasten und plazentare „bed giant“ Zellen gehören, migrieren aus der Zytotrophoblasten-Schale durch das Stroma der Dezidua und wandeln mütterliche Spiralarterien so um, dass der Blutstrom zum Ort der Implantation umgeleitet wird.

Endovaskuläre Trophoblasten durchbrechen dabei die Arterienwände mütterlicher Spiralarterien und werden in das Endothel integriert. Interstitielle Trophoblasten dringen durch das Stroma der Dezidua bevor sie in dem inneren Myometrium verschmelzen um die sog. placental bed giant cells zu bilden. Während sie die Uterusschleimhaut infiltrieren, vermengen sich die extravillösen Trophoblasten mit Leukozyten der Mutter, den charakteristischen CD56 bright uterinen Natürlichen Killer-Zellen (uNK), sowie HLA-DR+ Makrophagen und dendritischen Zellen.

Die uNK-Zellen, die in großen Mengen im Implantationsbereich vorkommen, weisen keine Zytotoxizität gegenüber invasiven extravillösen Trophoblasten auf. Es wird viel mehr davon ausgegangen, dass sie die Vaskularisierung der Dezidua im Zuge der Implantation vermitteln (Hiby, Walker et al. 2004; Hanna, Goldman-Wohl et al. 2006; Trowsdale and Moffett 2008).

Uterine NK-Zellen exprimieren Rezeptoren aus der Familie der „killer cell immunoglobulin-like receptors“ (KIR), deren Liganden die von extravillösen Trophoblasten exprimierten humanen Leukozyten-Antigene (HLA) Klasse I - HLA-C, HLA-G und HLA-E - sind (Moffett and Loke 2006). Die Forschungsergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass die Modulation der Immunantwort in der Schwangerschaft durch die Wechselwirkung zwischen HLA-Molekülen der fetalen Trophoblasten und KIR-Molekülen der uNK-Zellen vermittelt wird (Moffett-King 2002; Hiby, Regan et al. 2008; Trowsdale and Moffett 2008).

Der Kontakt mit dem mütterlichen Immunsystem ist bei den beiden Trophoblasten-Arten unterschiedlich. Villöse Trophoblasten stehen in Kontakt mit dem systemischen mütterlichen Immunsystem, während extravillöse Trophoblasten in Wechselwirkung mit den lokalen Immunzellen der Mukosa treten.

Anhand der Morphologie der Plazentazotten lassen sich nach einander drei Entwicklungsstadien beobachten. Die zunächst auftretenden invadierenden Trophoblastenzapfen werden als Primärzotten bezeichnet. Durch Einsprossung extraembryonalen Mesenchyms entwickeln sich aus den Primärzotten Sekundärzotten, die sich im Zuge der fetalen Kapillarisation in Tertiärzotten differenzieren.

Die trennende Schicht zwischen dem kindlichen und mütterlichen Kreislaufsystem ist die sog. Plazentaschranke, bestehend aus dem Kapillarendothel der fetalen Blutgefäße, dem Bindegewebe im Zottenkern, der Zytotrophoblasten und dem synzytialen Überzug. Im Laufe der Schwangerschaft verschmälert sich jedoch die Zytotrophoblastenschicht und die fetalen Zottenkapillaren verschieben sich randständig, so, dass die Diffusionsbarriere (Plazentaschranke) zwischen fetaler Kapillare und mütterlichem Sinus auf ein Minimum reduziert wird.

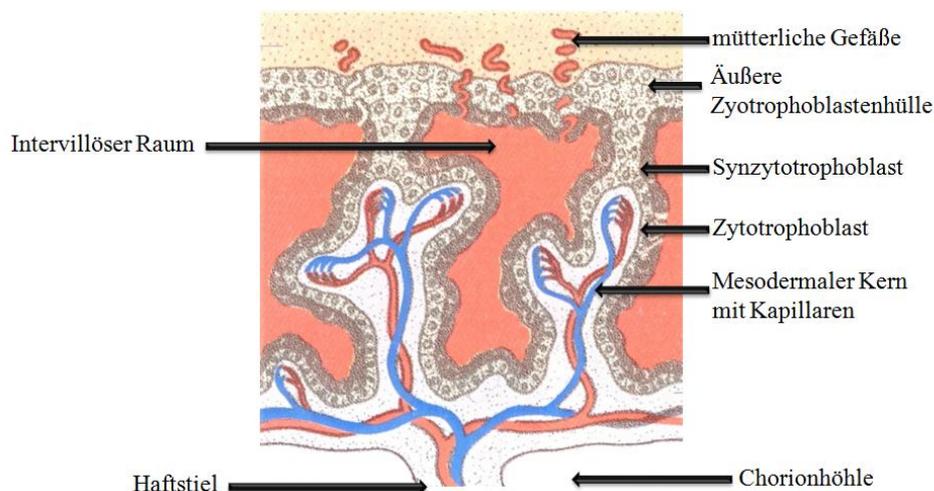


Abbildung 1.2-3-Längsschnitt durch eine Chorionzotte

Dargestellt ist eine Chorionzotte am Ende der dritten Entwicklungswoche. Die mütterlichen Gefäße durchdringen die Zytotrophoblastenhülle und ergießen sich in die intervillösen Räume zwischen den Zotten. Die Zottenkapillaren stehen mit den Gefäßen am Haftstiel in Verbindung, die ihrerseits an den intraembryonalen Kreislauf angeschlossen sind. Angelehnt an (Sadler 1998)

Trotz der vollständigen räumlichen Trennung beider Kreislaufsysteme ist der Transport von Antikörper vom Typ IgG mittel Transzytose möglich, der über den FcRn, einen Rezeptor auf der Synzytiotrophoblastenmembran vermittelt wird.

Da der Fetus ein semi-allogenes Transplantat für das mütterliche Immunsystem darstellt, kommt es während der Schwangerschaft an der fetal-maternalen Grenze zu Immunphänomenen, die eine Abstoßung verhindern (Messer, Schirren et al. 1993; Engineer, Bhol et al. 2000). Dies zeigt sich unter anderem in einer vorübergehenden Suppression der zellulären Immunität. Zu weiteren Mechanismen, die den Fetus vor der Abstoßung schützen gehört die fehlende Expression von klassischen HLA-Molekülen der Klasse I und der Klasse II auf villösen Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten (Hunt, Petroff et al. 2005). Das hauptsächlich auf extravillösen Trophoblasten exprimierte HLA-G, welches unter anderem an der schwangerschaftstypischen Verschiebung des Zytokinprofils zugunsten der Th2-Immunantwort beteiligt ist, hat einen entscheidenden Einfluss auf die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz gegenüber dem Fetus (Yip, McCluskey et al. 2006).

HLA-G kann als Ligand an die inhibitorisch wirkenden Rezeptoren LIR-1 (leukocyte Ig-like receptor 1), LIR2 und KIR2DL4 binden und dadurch mit Zellen des Immunsystems wie NK-Zellen, B- und T-Lymphozyten interagieren (Hviid 2006).

Die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen zeigten, dass die Bindung des fetalen HLA-G mit dem auf NK-Zellen vorkommenden inhibitorischen Rezeptors KIR2DL4 der NK-zellvermittelten Lyse entgegenwirkt (Ponte, Cantoni et al. 1999; Rajagopalan and Long 1999; Riteau, Rouas-Freiss et al. 2001; Menier, Riteau et al. 2002). Desweiteren gibt es Anhaltspunkte, dass HLA-G über die LIR-1- und KIR2DL4-Rezeptoren auf die CTL-vermittelte Lyse einen inhibitorischen Effekt ausübt (Rouas-Freiss, Khalil-Daher et al. 1999).

Obwohl die genauen Pathomechanismen des PG bisher noch weitgehend unbekannt sind, wird von verschiedenen Autoren angenommen, dass die Induktion der Autoimmunreaktion auf die Präsentation von plazentarem BP180 in Kontext mit aberrant exprimierten und von dem mütterlichen Haplotyp unterschiedlichen paternalen HLA-Klasse-II-Molekülen zurückzuführen ist (Kelly, Black et al. 1989; Shimanovich, Brocker et al. 2002). Auf diese Weise soll die Produktion von spezifischen Antikörpern, die mit der mütterlichen Haut kreuzreagieren, getriggert werden. Das Autoantigen BP180 wird, wie bereits erwähnt, in verschiedenen Trophoblastensubpopulationen schon im ersten Trimenon exprimiert (Huilaja, Hurskainen et al. 2008). Somit setzten die ersten klinischen Symptome des PG erst nach der Expression des Autoantigens in der Plazenta ein. Huilaja et al. konnten jedoch keine pathologischen Veränderungen in Bezug auf die Expressionsrate oder Immunlokalisation des

BP180 bei den drei in die Studie miteinbezogenen Plazenten feststellen (Huilaja, Hurskainen et al. 2008).

In seltenen Fällen wurde das PG auch in Zusammenhang mit schwangerschaftsassozierten Trophoblastentumoren bei Frauen beschrieben (Tillman 1950; Dupont 1974; Tindall, Rea et al. 1981; do Valle Chiossi, Costa et al. 2000; Djahansouzi, Nestle-Kraemling et al. 2003; 2004). Es wird eine gutartige, nicht invasive Form (Blasemole, Mola hydatidosa) von einer destruierend wachsenden metastasiernden Form (Chorioncarcinom) unterschieden.

Das Chorioncarcinom der Frau entsteht zu ca. 50% aus einer Blasemole, eine durch abnorme Eizellbefruchtung entstandene Wucherung der Trophoblastenzellen. Etwa ein Drittel findet man im Anschluss an einen Abort, 25% nach einer Tubarschwangerschaft, wobei das Erbgut bei dem Chorioncarcinom der Frau jeweils in der Regel von beiden Elternteilen stammt.

Das Chorioncarcinom des Mannes entwickelt sich im Gegensatz zu dem der Frau aus syngemem Gewebe. Die Tatsache, dass bei männlichen Erkrankten bislang keine PG-ähnlichen Autoimmundermatosen beschrieben wurden, erhärtet den Verdacht, dass die allogene Reaktivität einen entscheidenden Faktor bei der Ätiopathogenese des PG darstellt (Jenkins Rachel E 2002).

Die hormonelle Regulation stellt einen weiteren ätiopathogenetischen Faktor dar. Berichte über Verschlechterungen bzw. Exazerbationen post partum und in Zusammenhang mit der Menstruation sowie der Einnahme von oralen Kontrazeptiva verdeutlichen den Zusammenhang (Shornick, Bangert et al. 1983; Jenkins, Shornick et al. 1993).

1.3 Assoziation des Pemphigoid gestationis mit Allelen des HLA-Systems

Für die Bekämpfung intrazellulärer Pathogene und entarteter Zellen durch die zelluläre Immunantwort, ist das Vermögen „Eigenes“ von „Fremdem“ unterscheiden zu können von essentieller Bedeutung. Die dazu erforderliche Präsentation von Peptiden wird über die Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes („major histocompatibility complex“ MHC) vermittelt. Diese, beim Menschen als HLA-Moleküle (humane Leukozyten-Antigene) bezeichneten Antigene, werden auch als Transplantationsantigene bezeichnet aufgrund ihrer Bedeutung bei Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen. Da bei dem PG eine Häufung bestimmter HLA-Allele bekannt ist, wird im Folgenden zum besseren Verständnis der vorliegenden Arbeit, auf Aufbau, Funktion und Verteilung der HLA-Antigene eingegangen.

1.3.1 Aufbau und Funktion des HLA-System

1.3.1.1 Genorganisation und Genetik des HLA-Komplexes

Die Gene des HLA-Komplexes (Humanes Leukozyten-Antigensystem) sind auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert. Dieser Komplex umfasst einen Genabschnitt von ca. 3500 Kilobasen (kb). In diesem Bereich lassen sich die Regionen der HLA-Klasse-I und HLA-Klasse-II sowie der Klasse-III-Gene unterscheiden.

Genorte in der HLA-Klasse-I-Region kodieren für die α -Kette der HLA-Klasse-I-Antigene. Das für die β -Kette, β_2 -Mikroglobulin, kodierende Gen ist auf Chromosom 15 lokalisiert.

Die Untereinheiten der HLA-Klasse II-Moleküle - die α - und β -Kette – werden von unterschiedlichen Genorten in der HLA-Klasse-II-Region kodiert.

Innerhalb der HLA-Klasse-I-Region liegen die Genorte HLA-A, B und C, die die klassischen HLA-A, B, C Moleküle kodieren sowie die Genorte HLA-E, F, G und H, die die nicht klassischen HLA-Moleküle kodieren.

Die HLA-Klasse-II-Genregion ist in drei Subregionen unterteilt, die für die unterschiedlichen HLA-Klasse-II-Antigene kodieren. Die HLA-DR-Subregion enthält ein monomorphes Gen für die α -Kette (*DRA*) und maximal neun Gene für die β -Kette (*DRB1-DRB9*).

Die HLA-DQ-Subregion weist jeweils zwei potentiell funktionelle Genorte für α - und β -Ketten (*DQA1*, *DQA2*, *DQB1*, *DQB2*) auf. Nur die Loci *DQA1* und *DQB1* kodieren entsprechende Proteinketten. *DQA2* und *DQB2* sind Pseudogene.

Die HLA-DP-Subregion enthält zwei funktionelle Loci für jeweils eine α - und β -Kette sowie jeweils ein Pseudogen für jede Kette (*DPA2*, *DPB2*).

Sämtliche Gene, die für HLA-Klasse II Antigene kodieren, werden auf Transkriptionsebene koordiniert reguliert, wobei die HLA-DR-Expression am höchsten ist. Die konstitutive als auch IFN- γ induzierte Transkription der HLA-Klasse-II-Gene wird durch den Class-II Transactivator (CIITA) vermittelt (Harton and Ting 2000).

Zwischen der HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Region befindet sich die sog. MHC-Klasse-III-Region, mit den Genen die z.B. die Komplementfaktoren C2, Faktor B, C4A und C4B kodieren (Jenkins, Shornick et al. 1993; Shornick, Jenkins et al. 1995). Bei den beiden C4-Isotypen C4A und C4B handelt es sich um polymorphe Gene mit über 15 (C4A) und 20 (C4B) Varianten (Shornick, Jenkins et al. 1995). Null-Allele kommen in beiden Genloci sehr häufig vor (Shornick, Jenkins et al. 1995). Ein Kopplungsungleichgewicht zwischen HLA-DRB1*03 und den C4-Nullalelen (C4*QO) ist in westeuropäischen Bevölkerungen sehr häufig. Aus diesem Grund ist das C4QO-Allel relevant für Erkrankungen mit einer hohen HLA-DR3-Frequenz.

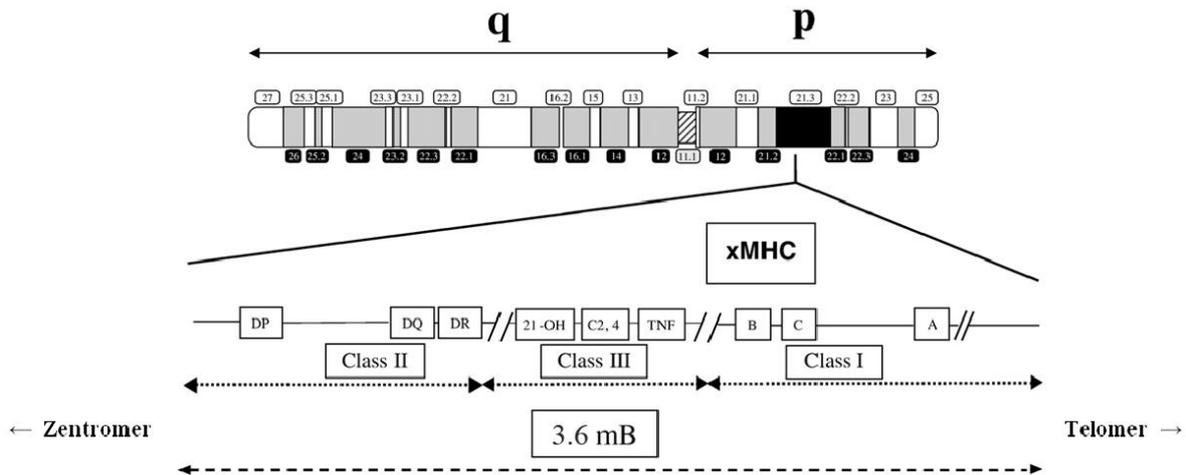


Abbildung 1.3-1-HLA-Komplex auf dem Chromosom 6

Schematische Darstellung der chromosomalen Organisation der Klasse-I-, II- und III-Genregionen des HLA-Komplexes. Für die Klasse II-Gene sind die Genorte DP, DQ und DR dargestellt. Bei der sich telomerwärts anschließenden Klasse-III-Region sind beispielhaft die Genorte für die Steroid-21-Hydroxylase (21-OH), für die Komplementfaktoren C2 und C4 sowie die Genloci für die Tumornekrosefaktoren (TNF α - und β) aufgeführt. Bei den Klasse-I-Genen sind die Genorte B, C und A dargestellt. Angelehnt an (Taylor, Hussain et al. 2008)

Das HLA-System ist hoch polymorph, da es für die meisten Genloci zahlreiche Allele gibt. Die von der WHO aktuell anerkannten HLA-Allele sind in der IMGT/HLA Datenbank auffindbar (<http://ebi.ac.uk/imgt/hla>).

HLA-Allele sind in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen nicht gleich verteilt, dabei kann es große Unterschiede in Bezug auf die Allel-Frequenz bei Bevölkerungsgruppen unterschiedlicher ethnischer Zugehörigkeiten geben.

Die Allele der verschiedenen HLA-Loci werden auf dem Chromosom 6 gekoppelt in sog. Haplotypen vererbt. Jedes Individuum erbt somit von Vater und Mutter je einen HLA-Haplotyp und es werden zwei Allele eines jeden Genortes exprimiert (kodominante Vererbung). Das heißt, dass jeder Mensch Träger zweier spezifischer Antigenvarianten jeder Merkmalsgruppe (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP) ist.

Zwischen bestimmten Allelen besteht ein Kopplungsungleichgewicht. Das bedeutet, dass in einer Bevölkerung bestimmte HLA-Allele verschiedener Loci häufiger gekoppelt vererbt werden, als es sich bei der Berücksichtigung der Frequenz der Allele statistisch errechnen lassen würde. Häufige Haplotypen sind: A1 B8 DR3 und A2 B7 DR2.

1.3.1.2 Struktur und Funktion der HLA-Klasse-I-Moleküle

HLA-Antigene zählen aufgrund ihrer Domänenstruktur zu Molekülen der Immunglobulin-superfamilie.

HLA-Moleküle der Klasse I setzen sich aus zwei Polypeptidketten, einer polymorphen 45 kD α -Kette und einer nicht-polymorphen 12 kD Kette, dem β_2 -Mikroglobulin, zusammen. Die α -Kette gliedert sich in 3 extrazelluläre Domänen, einen Transmembranbereich und einen zytosolischen Anteil. Das β_2 -Mikroglobulin ist nicht-kovalent an die α_3 -Domäne gebunden. Die zwei membranfernsten Domänen α_1 und α_2 bilden die sog. Peptidbindungsgrube, wo Peptide mit einer Länge von 8 bis 11 Aminosäuren gebunden werden.

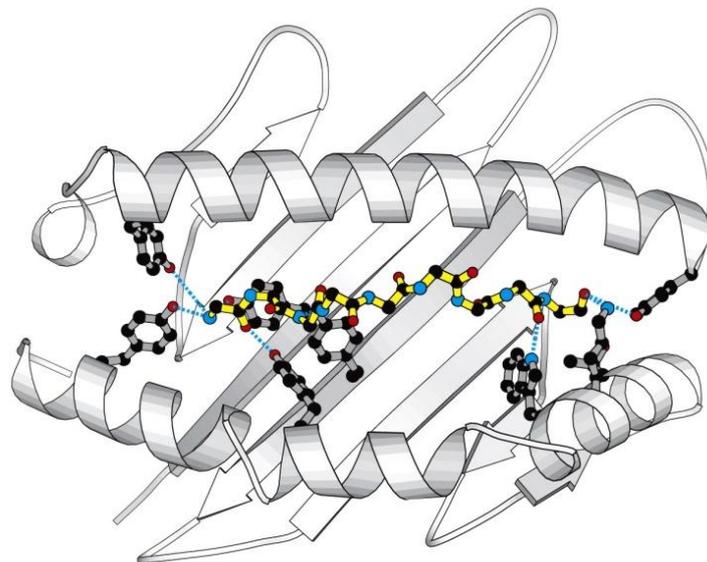


Figure 3-18 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Abbildung 1.3-2-MHC-Klasse-I-Molekül mit gebundenem Peptid

MHC-Klasse-I-Moleküle binden Peptide (gelb dargestellt) durch eine Reihe von H-Brücken und Ionenbindungen (blau gestrichelt). Der Aminoterminus befindet sich auf der linken, der Carboxylterminus auf der rechten Seite. Schwarze Kugeln stellen Kohlenstoffatome, rote Sauerstoffatome und blaue Stickstoffatome dar. Das Rückgrat der Klasse I schweren Kette ist im Bändermodell dargestellt. Polymorphe Aminosäuren der α_1 - und der α_2 -Domäne bestimmen, welches Peptid gebunden werden kann. (Murphy 2008).

HLA-Klasse-I-Moleküle kommen auf fast allen kernhaltigen Zellen vor und dienen der Präsentation von Fremd, Selbst- und Alloantigenenfragmenten der Zelle gegenüber den T-Lymphozyten. Die entsprechenden Antigenfragmente entstehen durch intrazelluläre Prozessierung, wobei HLA-Moleküle der Klasse I vor allem Peptide, die aus im Zytoplasma der Zelle abgebauten Proteinen stammen, binden. CD8⁺ Zellen können durch die HLA-

Klasse I-vermittelte Peptidpräsentation infizierte und entartete Zellen, die körperfremde Proteine herstellen, identifizieren und eliminieren.

Die Expressionsrate der klassischen HLA-Klasse-I-Moleküle kann durch die Stimulation von Zytokinen wie Interferon- γ hochreguliert werden.

Eine weitere Funktion der HLA-Klasse-I Moleküle ist die Inhibition von NK-Zellen über die entsprechenden Rezeptoren, KIR-Moleküle und CD94/NKG2A. NK-Zellen erkennen geschädigte Körperzellen über eine Deregulation der HLA-Klasse-I-Zelloberflächenexpression und reagieren entweder mit der Sekretion von Zytokinen oder Exozytose zytotoxischer Granula. Die Stimulation aktivierender Rezeptoren auf NK-Zellen hat die Zerstörung der Zielzelle zur Folge. Die Bindung inhibitorischer NK-Rezeptoren an passende HLA-Moleküle der Klasse I schützt die Zielzelle vor der Lyse (Munz, Holmes et al. 1997).

Die Aufgabe der nicht-klassischen MHC-I-Moleküle ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Das monomorphe HLA-G wurde bisher nur in Zytotrophoblasten und einigen Tumorgeweben beschrieben. Hingegen kommen HLA-E und HLA-F in vielen fetalen und erwachsenen Geweben vor (Carosella, Kirszenbaum et al. 1995).

HLA-G kommt in der Hauptsache auf extravillösen Trophoblasten vor, die in direktem Kontakt mit maternalen immunkompetenten Zellen stehen (McMaster, Librach et al. 1995). Das Überleben des Feten wird, wie bereits erwähnt, durch Inhibition der NK-Zell-vermittelten Lyse und/oder ein entsprechendes Zytokin-Profil der dezidualen Zellen gewährleistet (Loke and King 2000).

Über die Funktion von HLA-E ist noch wenig bekannt. Es konnte aber nachgewiesen werden, dass die Interaktion von HLA-E mit dem CD94/NKG2-Rezeptor die Zytotoxizität von NK-Zellen und T-Lymphozyten reduziert (Borrego, Ulbrecht et al. 1998).

1.3.1.3 Struktur und Funktion der HLA-Klasse-II-Moleküle

Die HLA-Moleküle der Klasse II bestehen ebenfalls aus zwei nicht kovalent gebundenen, membranverankerten Polypeptidketten, einer 33-35 kDa α -Kette und einer 27-29 kDa β -Kette. Sie werden auf allen Zellen, die zur professionellen Präsentation von Antigenen fähig sind, exprimiert. Hierzu zählen v.a. dendritische Zellen, B-Zellen und Monozyten.

Auf Fibroblasten, spezifischen Epithelien und Endothelien kann ihre Expression durch die Stimulation mit Zytokinen z.B. Interferon induziert werden. Ferner sind sie auch auf hämatopoetischen Progenitorzellen nachzuweisen.

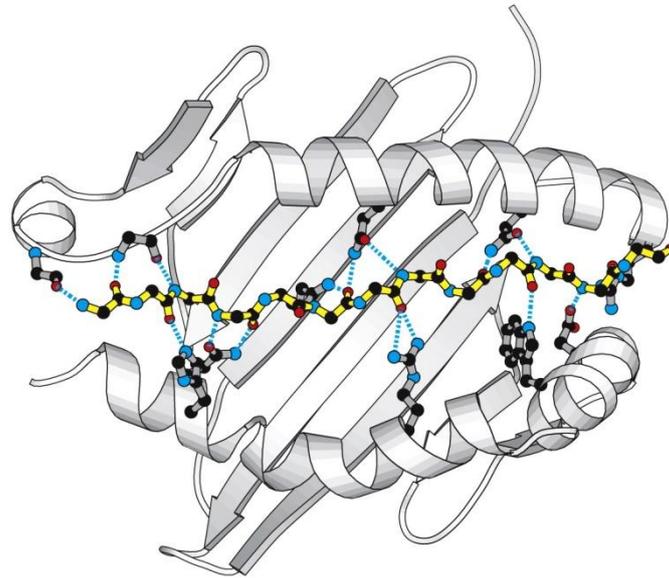


Figure 3-20 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Abbildung 1.3-3-Ein MHC-Molekül der Klasse II mit gebundenem Protein

Ein Peptid (gelb, dargestellt ist nur das Proteinrückgrat, mit dem Aminoterminus auf der linken und dem Carboxylterminus auf der rechten Seite) wird durch eine Vielzahl von H-Brücken (blau gestrichelt) gebunden, die über die ganze Länge des Peptids verteilt sind. Angelehnt an (Murphy 2008).

HLA-Klasse-II-Moleküle binden vor allem Peptide, die aus Antigenen des extrazellulären Raumes stammen und über endosomale Kompartimente aufgenommen und verdaut werden. Die prozessierten Fremdantigene werden auf diese Weise T-Lymphozyten (z.B. CD4⁺-Zellen) präsentiert. CD4⁺ Zellen können die Produktion spezifischer Antikörper durch B-Lymphozyten und die Aktivität von Phagozyten stimulieren, die Krankheitserreger inaktivieren und eliminieren.

1.3.1.4 Gewebeverteilung der HLA-Antigene auf Plazentagewebe

In Hinblick auf die Induktion der Autoimmunantwort, die zu dem Krankheitsbild Pemphigoid gestationis führt, ist die Gewebeverteilung der HLA-Moleküle auf fetalen Zellen von Bedeutung. Humane Trophoblasten-Zelllinien exprimieren ein ungewöhnliches Repertoire an HLA-Molekülen. Insbesondere die Gene der HLA-Klasse-I Moleküle zeichnen sich einerseits

durch eine starke Homologie ihrer DNA und Proteinsequenzen auf und andererseits durch einen starken Polymorphismus hypervariabler Regionen aus. Dieser Umstand erschwert es die verschiedenen HLA-Allotypen mittels monoklonaler Antikörper-Technik zu bestimmen, da es zu Kreuzreaktionen mit den verschiedenen Antigenvarianten kommt.

Apps et al. analysierten die HLA-Expression auf primären Trophoblasten, in dem sie monoklonale Antikörpertechnik mit Gentypisierungsverfahren kombinierten (Apps, Murphy et al. 2009). In Übereinstimmung mit anderen Studien konnte definitiv gezeigt werden, dass extravillöse Trophoblasten HLA-G, HLA-C und HLA-E exprimieren, jedoch keine HLA-A-, HLA-B-, HLA-F- oder HLA-DR-Moleküle (Kovats, Main et al. 1990; King, Boocock et al. 1996; Loke, King et al. 1997; Murphy and Tomasi 1998; King, Allan et al. 2000; King, Burrows et al. 2000; Blaschitz, Hutter et al. 2001; Ishitani, Sageshima et al. 2003; Hunt, Petroff et al. 2005; Apps, Gardner et al. 2007; Apps, Gardner et al. 2008; Apps, Gardner et al. 2008; Apps, Murphy et al. 2009).

Die HLA-Expression primärer extravillöser Trophoblasten ändert sich durch IFN- γ -Einfluss unwesentlich. Apps et al. konnten lediglich ein geringes Hochregulieren der HLA-C-Expression, jedoch weder einen signifikanten Effekt auf die HLA-G-Expressionsrate noch eine Induktion der HLA-A- oder HLA-B-Gene beobachten (Harton and Ting 2000; Apps, Murphy et al. 2009).

Antigenpräsentierende Zellen, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen, die IFN- γ ausgesetzt werden, benötigen für die Transkription der HLA-Klasse-II Gene den CIITA. Die Ergebnisse diverser Studien konnten belegen, dass in menschlichen Trophoblasten dieser Transkriptionsfaktor auch nach IFN- γ -Einfluss nicht exprimiert wird (Morris, Riley et al. 1998; Murphy and Tomasi 1998; van den Elsen, Gobin et al. 2001; Apps, Murphy et al. 2009).

Auf primären extravillösen Trophoblasten konnte bislang keine HLA-DRB1-Expression nach IFN- γ -Stimulation nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse von Apps et al. bestätigen ebenfalls, dass EGFR+ villöse Trophoblasten, keine polymorphen HLA-Moleküle der Klasse I und II exprimieren und deshalb als immunologisch inert zu betrachten sind (Moffett and Loke 2006; Apps, Murphy et al. 2009).

Der HLA-Phänotyp villöser Mesenchymzellen ähnelt dem somatischer Zellen. Sie exprimieren HLA-A- und HLA-B-Antigene (Apps, Murphy et al. 2009).

1.3.2 Genetische Befunde bei der Erkrankung des Pemphigoid gestationis

Eine genetische Prädisposition für das PG wird durch eine signifikante Häufung bestimmter HLA-Allele bei den Betroffenen deutlich (Shornick, Stastny et al. 1981).

HLA-DRB1*03 wurde bei etwa 60-80% der Patientinnen mit PG beobachtet, HLA-DRB1*04 bei etwa 50%. Am eindrucksvollsten ist jedoch die Häufung des kombinierten Auftretens von HLA-DRB1*03 und DRB1*04, die bei 45% der Patientinnen nachgewiesen wurde. In der Normalbevölkerung kommt dieser Genotyp nur bei etwa 3% vor (Shornick, Stastny et al. 1981; Holmes, Black et al. 1982; Engineer, Bhol et al. 2000).

Paternale Antigene scheinen bei der Erkrankung ebenfalls von großer Bedeutung zu sein. Bei 50% der Partner der Betroffenen konnten Shornick et al. das HLA-DRB1*02-Allel nachweisen (Shornick, Stastny et al. 1981; Yancey 1990). Für das Mitwirken paternaler Faktoren spricht auch das hohe Risiko eines PG-Rezidivs bei gleicher Vaterschaft (Holmes, Black et al. 1983; Kelly, Black et al. 1989; Al-Fouzan, Galadari et al. 2006). Arbeitsgruppen älterer Studien führten das Auftreten rezidivfreier Schwangerschaften auf einen Partnerwechsel oder das völlige Übereinstimmen des HLA-DR-Locus von Mutter und Kind zurück (Holmes, Black et al. 1983; Shornick, Bangert et al. 1983).

Die bislang größte klinische Studie zu dem PG mit 87 Patienten sowie ein Fallbericht aus dem Jahr 1995 konnten diese Vermutungen nicht bestätigen. Diese Arbeitsgruppen berichteten über das Auftreten rezidivfreier Schwangerschaften, bei denen im Vergleich zur vorherigen Schwangerschaft kein Partnerwechsel vorlag und bei denen die spätere HLA-Typisierung von Mutter und Kind keine Übereinstimmung des HLA-DR-Locus ergab (Ibbotson and Lawrence 1995; Jenkins, Hern et al. 1999).

Ein Großteil der PG-Patientinnen weist Antikörper gegen paternale HLA-Antigene der Klasse I auf (Reunala, Karvonen et al. 1977; Shornick, Stastny et al. 1983; Shornick, Jenkins et al. 1993). Diese Antikörper sind jedoch nicht spezifisch für das PG. Bisher ist unklar, ob sie ein Epiphänomen darstellen oder von pathogenetischer Bedeutung sind (Chimanovitch, Brocker et al. 2001).

Ferner ist eine Häufung der C4-Null-Allele (C4*QO), insbesondere mit C4A*QO bei PG-Patienten beschrieben. Ob das C4-Null-Allel, kodiert in der MHC-Klasse-III Region oder die HLA-Klasse-II-Allele DRB1*03 und DRB1*04 die primäre genetische Assoziation mit dem PG darstellen und welche als sekundär zu betrachten sind, weil sie mit letzteren gekoppelt sind (linkage disequilibrium), konnte bisher noch nicht geklärt werden (Shornick, Artlett et al. 1993).

Studien mit Patienten anderer ethnischer Zugehörigkeiten konnten eine genetische Assoziation des PG bestätigen. In einer 2003 durchgeführten Studie mit Patienten kuwaitischer Herkunft wurde die signifikante Häufung der Allele HLA-DRB1*03 und HLA-DQB1*02, die sich in einem Kopplungsungleichgewicht befinden, gezeigt (Nanda, Al-Saeed et al. 2003). Bei einer 1999 durchgeführten Studie mit Probanden mexikanischer Abstammung wurde eine Häufung von HLA-DR3- und HLA-DR4-Antigene beobachtet (Garcia-Gonzalez, Castro-Llamas et al. 1999).

Das Vorhandensein der HLA-DRB1*03- und HLA-DRB1*04-Allele oder ihr kombiniertes Auftreten scheint für die Pathogenese von großer Bedeutung zu sein, ist aber nicht unerlässlich für das Auftreten der Erkrankung (Rachel E. Jenkins 1993). Diese beiden Haplotypen gehen jeweils unabhängig von einander mit einer gesteigerten Ansprechbarkeit des Immunsystems einher (Svejgaard, Morling et al. 1981).

1.3.3 Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen

Das Auftreten von HLA-DRB1*03 und HLA-DRB1*04 ist auch mit Autoimmunerkrankungen wie Dermatitis herpetiformis, Zöliakie, Morbus Sjögren, Morbus Addison, Autoimmunthyreoditis (Morbus Basedow) und perniziöser Anämie assoziiert (Holmes, Black et al. 1982; Shornick and Black 1992). Das gehäufte Auftreten von HLA-A1, B8, DRB1*03 und DRB1*04 weist darauf hin, dass Patientinnen mit PG eine erhöhte Bereitschaft haben weitere Autoimmunerkrankungen zu entwickeln (Mayou, Black et al. 1988; Shornick and Black 1992).

2. Zielsetzung

Mit der Entdeckung der humanen Leukozytenantigene Ende der 1950-er Jahre, ihres Polymorphismus und der Erkenntnis, dass sie eine wichtige immunologische Funktion haben, sind zahlreiche Erkrankungen auf einen Zusammenhang von HLA und Krankheiten untersucht worden. Diese Untersuchungen führten zur bahnbrechenden Erkenntnis, dass etwa 40-50 Erkrankungen eine Assoziation bzw. Kopplung sowohl mit HLA-Merkmalen der Klasse I als auch Klasse II aufweisen. Interessanterweise zeigen insbesondere Erkrankungen, die als Autoimmunerkrankungen aufgefasst werden, oftmals eine ausgeprägte Assoziation mit HLA-Merkmalen. Bei der Autoimmunerkrankung Pemphigoid gestationis wurde eine genetische Prädisposition für Trägerinnen der HLA-DRB1*03, *04-Allele und der Nullallele des C4-Komplementfaktors, insbesondere für C4A*QO positive Träger von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen. Der Einfluss paternaler Antigene wird auch aufgrund der Häufung von HLA-DRB1*02 bei den Partnern betroffener Patientinnen diskutiert. Trotz dieser Erkenntnisse ist der genaue Pathomechanismus, der zur Induktion der Autoimmunreaktion führt und die Rolle, die HLA-Antigene bei der Reaktion spielen, noch nicht vollständig geklärt. In der vorliegenden Arbeit sollte der mögliche Einfluss der HLA-Haplotypen betroffener Familien (Mütter, Väter und Kinder) auf das Erkrankungsrisiko untersucht werden. Für die HLA-Komplettypisierung (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 und -DPB1) des Patientenkollektivs wurde die DNA-Sequenzanalyse mit hoher Auflösung (vier digits) gewählt.

Zur weiteren Überprüfung auf Gemeinsamkeiten der Allele, wurden die polymorphen Regionen der ermittelten Allele des PG-Patientinnenkollektivs mithilfe der IMGT/HLA Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>) in die Aminosäuresequenz übersetzt und verglichen. Desweiteren wurden die HLA-C- und B-Allele kompletter Familien den Kategorien C1, C2, Bw4 und Bw6 zugeteilt, die für die Erkennung durch inhibitorische Rezeptoren auf NK-Zellen relevant sind, und auf Gemeinsamkeiten untersucht.

3. Material

3.1 Studienkollektiv

3.1.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv umfasste 18 Patientinnen mit Pemphigoid gestationis, welche sich in ambulanter Betreuung durch die 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 Immungenetik überwiesen wurden, verwendet. Die Diagnose Pemphigoid gestationis wurde anhand klinischer, histologischer, serologischer und immunologischer Kriterien gesichert. Insgesamt wurden 27 DNA-Proben von Partnern und Kindern der betroffenen Frauen gewonnen. Als Material zur DNA-Isolierung wurde nach schriftlichem Einverständnis venös entnommenes Vollblut verwendet.

3.1.2 Kontrollkollektiv

Als Kontrollgruppe dienten die Typisierungsdaten von 383 männlichen und 364 weiblichen unverwandten Thrombozytenspendern. Die Daten wurden durch das Labor für Immungenetik und Molekularer Diagnostik der Universität München zur Verfügung gestellt.

Da bei dieser Kontrollgruppe keine Typisierungsdaten für HLA-C und HLA-DP vorlagen, wurden für die Berechnungen Referenzdaten aus Datenbanken herangezogen.

Für den HLA-C-Locus wurden die Allelfrequenzen einer europäischen Population der NMDP (National Marrow Donor Program) Datenbank entnommen: <http://bioinformatics.nmdp.org/>.

Als Referenzdaten für HLA-DP dienten zwei Kollektive, die beide der Allele Frequencies Datenbank (<http://www.allelefreqencies.net.>) entnommen wurden. Das Kontrollkollektiv „Essen Germany“ umfasst 174 Nieren und Blutspender deutscher Herkunft. Die Typisierungen wurden 1996 mithilfe sequenzspezifischen Primern (SSP) unter Leitung von S. Ferencik und H. Grosse-Wilde der Universität Essen durchgeführt. Das Kollektiv „Pop 2“ umfasst 206 europäische Probanden mit kaukasischer ethnischer Zugehörigkeit. Die Typisierungen wurden 1993 ebenfalls mithilfe SSP unter der Leitung von Prof. Dr. E. Albert des Labors für Immungenetik der Universität München durchgeführt.

3.2 Kits und Chemikalien

3.2.1 Material für die DNA-Isolierung

QIAamp Blood Midi Kit Qiagen

3.2.2 Materialien für die Polymerasekettenreaktion

- Aqua ad iniectabila	Braun
- Desoxynukleotid-Lösung (dNTP) (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Amersham Pharmacia
- Taq DNA-Polymerase	Roche
- PCR-Puffer 10x	Qiagen
-RCP Puffer Coral Load	Qiagen
- Glycerin 50%	Sigma
- Q Solution	Qiagen
- DTT (Dithioeritol)	Sigma
- BSA	Sigma
- DMSO	Sigma
- Betain	Fluka
- Cresolrot	Sigma

3.2.3 Material für die Agarosegelelektrophorese

- 100 bp DNA Molekulargrößenstandard	Invitrogen
- Biozym-LE Agarose	Biozym
- Ethidiumbromid	0,07%, Sigma
- 50x TEA:	Tris: 40 mM x 50 EDTA: 2 mM x 50 Acetat: 20 mM x 50, auf pH 8,0 eingestellt
- DNA – Auftragspuffer:	10 mM Tris/HCl pH 8,0 2 mM EDTA 20% Ficoll 0,25% Orange G

3.2.4 Materialien für Amplifikat-Reinigung

Ampure Magnetic Beads	Agentcourt (Bioscience Beckman Coulter)
70%iger Ethanol (hergestellt aus Ethanol absolut)	Merck
Wasser, HPLC für Gradientenanalyse	Roth
96 Well Magnetplatte (Dynal MPC®-9600)	Dynal A.S, N-0212 Oslo

3.2.5 Materialien für die Sequenzier-Polymerasekettenreaktion

Wasser, HPLC für Gradientenanalyse	Roth
Big Dye® Terminator, Cycle sequencing Kit	Applied Biosystem, Weiterstadt
Primer (siehe 3.3)	Thermo Scientific, Ulm

3.2.6 Materialien für die Reinigung der Sequenzierreaktion

CleanSEQ magnetic beads	Agencourt Bioscience (Beckman Coulter)
Wasser, HPLC für Gradientenanalyse	Roth
85%iger Ethanol (hergestellt aus Ethanol absolut)	Merck
Decköl	Henry Lamotte oils GmbH

3.3 Oligonukleotide

Für die Amplifikation der polymorphen Abschnitte der HLA- Loci wurden hauseigene Primer des Labors für Immungenetik und Molekularer Diagnostik der Universität München verwendet, die von der Firma Thermo scientific, Ulm hergestellt wurden.

Die Amplifikationsprimer sind jeweils in den Introns lokalisiert, die Sequenzierprimer sind sowohl in den Introns als auch in den Exons lokalisiert.

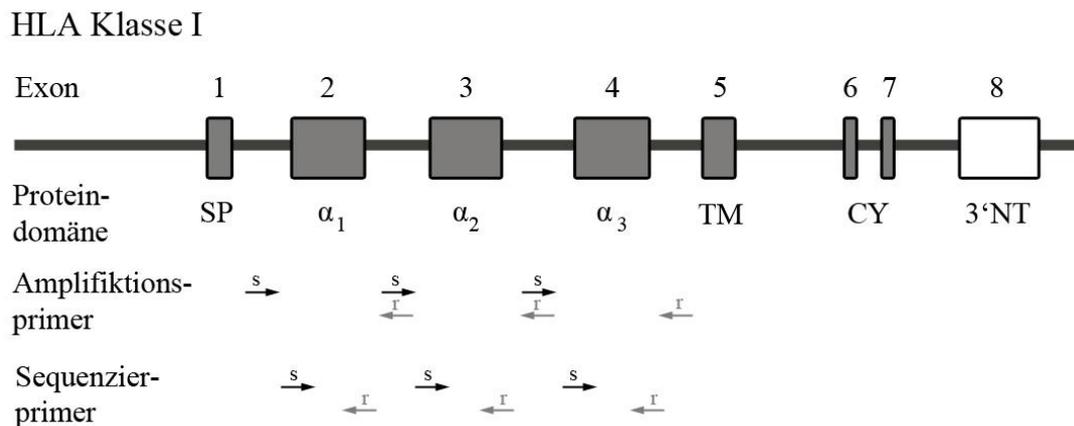


Abbildung 3.3-1-Schematische Darstellung der Exon und Intron-Struktur der HLA-Klasse-I-Genen

Die einzelnen Exons sind durch Rechtecke dargestellt, die Introns durch die zwischen den Exons befindende Linie. Oberhalb der schematischen Darstellung des Gens sind die einzelnen Exons nummerisch erfasst; Unterhalb sind die, durch die Exons codierten Domänen des Proteins angegeben. (SP = Signalpeptid; TM = Transmembranregion; CY = zytoplasmatische Region; 3'NT = 3' nicht translatierte Region). Die hochpolymorphen Exons 2 bis 4 wurden mit Intronprimern in beiden Richtungen amplifiziert. Diese sind mit schwarzen (sense) bzw. grauen Pfeilen (reverse) dargestellt.

Die Sequenzierprimer, die in den Introns und Exons lokalisiert sind, sind unterhalb ebenfalls mit Pfeilen in beiden Richtungen dargestellt.

3.3.1 Amplifikationsprimer

Locus	Richtung des Primers	Primer-Bezeichnung
HLA-A, Exon 2	Sense	5Ain1-46
	Reverse	Aseq2
HLA-A Exon 3	Sense	GFP5Ain2-225
	Reverse	3Ain3-66
HLA-A Exon 4	Sense	5Ain3-88
	Reverse	3Aex5-933 3Aex5-933(A32)
HLA-B Exon 2	Sense	5Bin1-57new
	Reverse	3Bin2-71
HLA-B Exon 3	Sense	GFP-5Bin2-245
	Reverse	3Bin3-66
HLA-B Exon 4	Sense	5Bin3-389cons
	Reverse	3Bin4-32
HLA-C Exon 2	Sense	5Cin1-61
	Reverse	3Cin2-110
HLA-C Exon 3	Sense	GFP-5Cin237new
	Reverse	3Cin3-66
HLA-C Exon 4	Sense	5Cin3-372+5
	Reverse	3Cin4(17)-77+3
HLA-DQB1 Exon 2	Sense	DQB5'
	Reverse	3DQB1-In2-169 3DQB1-In2-169(0301)
HLA-DQB1 Exon 3	Sense	DQ-In2-2997
	Reverse	3DQ-Bin3-Start+6
HLA-DPB1 Exon 2	Sense	GFP-DP5'
	Reverse	GFP-DP3'
HLA-DPB1 Exon 3	Sense	5DPB1-In2-(-130) 5DPB1-In2-(-129A)
	Reverse	3DPB1-In3-132

Tabelle 3.3-1-Amplifikationsprimer

Locus	Richtung des Primers	Primer-Bezeichnung
DRB1*01	Sense	5DRB1-367GTVarCvar1+3
	Reverse	2RB7
DRB1*03/11/13/14	Sense	1RB9VarCvar1+4
	Reverse	2RB28
DRB1*04	Sense	5DRB1-04-in1-367+2
	Reverse	2RB7
DRB1*07	Sense	5DRB1*07part2-2
	Reverse	3DRB1-07
DRB1*08/12/15/16	Sense	5DRB1-367GTVarCvar1+3
	Reverse	2RB28
DRB1*09	Sense	5DRB1-09-434+1
	Reverse	3DRB1-10-in2-40
DRB1*10	Sense	5DR10-in1-367
	Reverse	3DRB1-10-in2-40

Tabelle 3.3-2-Gruppenspezifische Primer für das Exon 2 von DRB1

3.3.2 Sequenzierprimer

Locus	Richtung des Primers	Primer-Bezeichnung
HLA-A, Exon 2	Sense	5Ain1-78seq
	Reverse	Aseq2
HLA-A Exon 3	Sense	5Aex3-1
	Reverse	3Ain3-66
HLA-A Exon 4	Sense	5SeqEx4-536
	Reverse	3Aex4seq15 3Cex4seq15 3Cex4-C17 2:1:1
HLA-B Exon 2	Sense	5Bex2seq
	Reverse	3Bin2-38seq
HLA-B Exon 3	Sense	5Bex3-seq(14)
	Reverse	3Bin3-44seq
HLA-B Exon 4	Sense	5SeqEx4-536
	Reverse	3Aex4seq15 3Cex4seq15 3Cex4-C17 2:1:1
HLA-C Exon 2	Sense	5Cex2-seq
	Reverse	3Cin2-22
HLA-C Exon 3	Sense	5Cex3-seq
	Reverse	3Cex3seq
HLA-C Exon 4	Sense	5SeqEx4-536
	Reverse	3Aex4seq15 3Cex4seq15 3Cex4-C17 2:1:1
DRB1	Sense	5DR-SEQ-21-TOP
	Reverse	*3DRB1rev-inno
	Sense	3DR-86GGT
	Reverse	5DR-SEQ-21-TOP
	Sense	5DR-Ex3-seqI(20); 5DR-Ex3-seqII(20); 5DR-Ex3-seqIII(20); 1:1:1
	Reverse	3DRex3 seq
HLA-DQB1 Exon 2	Sense	DQ5'SQ
	Reverse	3DQEx2 seq (13)
HLA-DQB1 Exon 3	Sense	5DQ3-306
	Reverse	3DQEx3-seq
HLA-DPB1 Exon 2	Sense	GFPphin
	Reverse	GFPback
HLA-DPB1 Exon 3	Sense	5DPb1-Ex3seq
	Reverse	3DP-in65(seqEx3)

Tabelle 3.3-3-Sequenzierprimer

3.4 Geräte

Spektralphotometer:	NanoDrop ND-1000
Thermocycler:	Biometra® T-Gradient Biometra® T3 Gradient
Zentrifugen:	Sigma 4-15 Eppendorf Centrifuge 5417C
Mikrowellenofen:	Bosch
Elektrophoresekammer:	Sub-cell® GT, BioRad
Spannungsquelle:	Power Pac 300, BioRad
UV-Transilluminator:	Gel-Doc System BioRad
Absaugpumpe:	Mini Vac E1 Axon Lab AG
Pipettierroboter:	Beckman Biomek 1000 Automated Laboratory Workstation
Sequenzierer:	ABI 3130xl Genetic Analyzer

4. Methoden

4.1 Allgemeine Vorgehensweise

Für die HLA-Typisierung wurde die DNA-Sequenzanalyse (Sequence Based Typing, SBT) mit hoher Auflösung (vier digits) gewählt. Diese außerordentlich zeitaufwendige Methode bietet die höchste Auflösung. Zunächst wird die zu untersuchende polymorphe Region im HLA-Bereich mittels PCR locuspezifisch oder nach Möglichkeit allel- oder gruppenspezifisch amplifiziert. Nach der PCR wird eine Sequenzierreaktion nach Sanger durchgeführt. Hierbei wird das Produkt der Sequenzierreaktion, also ein weiteres Amplifikat, markiert. Heute werden hierfür Fluoreszenz-markierte Didesoxynukleotide (dd’NTP’s) verwendet. Für jedes der dd’NTP’s wird ein anderer Farbstoff benutzt, so dass man die Abfolge der eingebauten Nukleotide anhand der fluoreszierenden Farben unterscheiden kann. Die Analyse erfolgt in einem Sequenziergerät. Dies geschieht mittels einer Kapillargelelektrophorese und des in den Sequenzierer eingebauten Laser/Detektor Konstrukts, das die unterschiedlichen Farben der markierten dd’NTP’s erfasst und über eine Software ein Diagramm und die entsprechende Sequenzabfolge zeichnet.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Isolierung genomischer DNA

Ausgangsmaterial für die DNA-Isolierung war mit EDTA versetztes venöses Vollblut (S-Monovette® 5 ml EDTA, Sarstedt), das bei +4°C gelagert wurde. Zur Isolation wurde das QIAamp Blood Kit (Qiagen®) gemäß der Herstellerangaben verwendet, das auf folgenden Prinzipien beruht: Lyse der Zellen durch Detergentien, enzymatischer Verdau mit der Proteinase K, vollständiges Entfernen der gelösten Stoffe durch Zentrifugation während die DNA durch Absorption an einer Silicat-Filtermembran (spin colum) zurückgehalten wird. Dies geschieht durch Bindung der negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren an positiv geladene Oberflächenmoleküle der Membran. Danach folgt die Entfernung störender Stoffe durch Waschen mit ethanolhaltiger Puffern und zuletzt wird die DNA mit Wasser oder niedrig konzentrierten Puffern eluiert.

Im Einzelnen wurde in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen 200 µl QIAGEN Proteinase pipettiert. Dazu wurden 2 ml Blut sowie 2,4 ml AL-Puffer gegeben. Das Gemisch wurde 15 Sekunden lang kräftig gemischt (gevortext), kurz zentrifugiert und anschließend 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurden 2 ml absoluter Ethanol hinzugefügt, die Lösung 15 Sekunden gevortext und in ein Zentrifugenröhrchen mit Filtermembran umpipettiert. An diesem Filter wurde die DNA bei dreiminütiger Zentrifugation bei 3000 rpm absorbiert. Durch mehrfaches Waschen mit AW1- und AW2-Puffer wurden störende Substanzen eliminiert. Abschließend wurden 300 µl Aqua ad injectabilia auf die Säulenmatrix pipettiert und nach zweiminütiger Inkubation bei 5000 rpm zentrifugiert. Die DNA löste sich somit von der Matrix. Die Aufbewahrung der DNA-Lösungen bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20°C.

4.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der wässrigen DNA-Lösungen wurde photometrisch unter Verwendung eines Spektralphotometers „Nano Drop“ bestimmt. Dabei wurde jeweils 1 µl unverdünnte Probelösung auf die Messvorrichtung aufgetragen und das Verhältnis der Adsorption der Lösung von 260 nm zu 280 nm bestimmt. Die DNA-Lösungen aus der Blutpräparation mit dem verwendeten QIAamp Blood Midi Kit haben etwa eine Konzentration von 95-130 ng/µl. Für die SBT eignet sich eine DNA-Konzentration von 20-30 ng/µl. Von sämtlichen DNA-Proben wurden für die Typisierung Verdünnungen mit einer Konzentration von 25 ng/µl hergestellt.

4.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)-Amplifikation der Genabschnitte

Zur Analyse der HLA-Klasse -Gene HLA-A, B und C wurde eine getrennte Amplifikation von Exon 2, 3 und 4 mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) gewählt. Für die HLA-Klasse II-Loci HLA-DRB1, -DQB1, -DPB1- wurde eine getrennte Amplifikation von Exon 2 und 3 durchgeführt. Zur Bestimmung von HLA-DRB1, Exon 2 wurden zunächst gruppenspezifische Amplifikationen durchgeführt (DRB1*01; *03, 11, 13, 14; *04, *07; *08; 12, 15, 16; 09; 10) und die positiven Amplifikate in die SBT-Reaktion eingesetzt.

Die Technik der PCR ermöglicht es einen kurzen, definierten Teil eines DNA-Stranges 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 Oligonukleotide, Primer, ermöglichen nun der Taq-Polymerase die Kettenreaktion zu starten. Die Taq-Polymerase ist eine aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isolierte DNA-Polymerase. Da thermophile Bakterien sehr hohe Temperaturen tolerieren, 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 ihr die nötige freie 3'-OH-Gruppe zur Verfügung stellen. Der folgende PCR-Prozess besteht aus einer Anzahl von 30-50 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Jeder Zyklus besteht aus drei hintereinander folgenden Schritten:

- 1) Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94-96°C zum Trennen der Stränge
- 2) Anlagerung der Oligonukleotide (primer annealing) an die komplementären DNA-Stränge, wofür der Ansatz auf die geeignete Anlagerungstemperatur (zwischen 50 und 65°C, je nach Primer) abgekühlt wird.
- 3) Elongation der angelagerten 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 dieser 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 wird eine PCR-Lösung, die unter anderem die vier d'NTP's (d'ATP, d'GTP, d'CTP, d'TTP) und die Taq-Polymerase enthält, eine Primerlösung mit den für die Zielsequenz spezifischen Oligonukleotidn und die als Matrize dienende DNA benötigt. Die Zusammensetzung eines 21 µl fassenden PCR-Ansatzes ist in Tabelle 4.2.1 dargestellt.

Reagenz	Zusammensetzung	Menge pro Ansatz	Gesamtvolumen
10x PCR-Lösung	120 µl PCR-Puffer Y, 2,5 µl Taq-Pol.	12 µl	
Primerlösung	10 µl Sense Primer 10 µl Reverse Primer , 80 µl Wasser	5 µl	
DNA		4 µl	21 µl

Tabelle 4.2-1-PCR-Ansatz

Die Zusammensetzung des PCR Puffers Y wurde von Dr. K. Witter (Labor für Immungenetik und Molekulare Diagnostik des Klinikums der Universität München) entwickelt. Die genaue Zusammensetzung ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Reagenz-Lösung	Zusammensetzung	Gesamtvolumen
PCR-Puffer Y	400 µl Qiagen 10x PCR Puffer 250 µl Qiagen RCP Puffer Coral Load 300 µl dNTP (10 mM Amersham) 400 µl Glycerin 50% (=228 µl 87% + 172 µl H ₂ O) 500 µl Q Solution 70 ml DTT (50 mM=0,1 g in 13 ml H ₂ O lösen) 40 µl BSA 10 mg/ml (1:10) 50 µl DMSO 400 µl 5 M Betain 15 µl Cresolrot 2 ml H ₂ O	
		74,355 ml

Tabelle 4.2-2 Zusammensetzung des PCR-Puffers Y

Die Amplifikation der HLA-Loci A, B, C und DQB1 erfolgte in einem Cycler der Firma Biometra unter folgenden PCR-Bedingungen:

94°C 2min; 10 x(94°C 10 s, 59°C 1 min), 40 x(94°C 10 s, 56°C 50 s, 72°C 30 s); 10°C.

Für die gruppenspezifische Amplifikation von HLA-DRB1 Exon 2, sowie für die Amplifikation von HLA-DPB1 wurden folgende PCR-Bedingungen gewählt:

94°C 2 min.; 10 x(94°C 10 s, 66°C 1 min); 20 x(94°C 10 s, 62°C 50 s, 72°C 30 s); 4°C.

4.2.4 Kontrolle der Amplifikation mittels Agarosegelelektrophorese

Der Nachweis der Amplifikate erfolgte mithilfe einer Agarosegelelektrophorese. Fehlende Amplifikationsbanden wurden als Misserfolg der PCR interpretiert mit Ausnahme bei der Bestimmung von HLA-DRB1 und die PCR musste wiederholt werden.

Anhand der positiven gruppenspezifischen HLA-DRB1, Exon 2, Amplifikate (maximal 2) kann eine Grobtypisierung erfolgen und die positiven Amplifikate dienen als Ausgangsprodukt für die Sequenzierung.

Die PCR-Produkte müssen in einem zu erwartenden Größenbereich liegen. Dadurch sind richtige und unspezifische (falsch positive) PCR-Produkte unterscheidbar. Durch einen parallel zu den PCR-Produkten aufgetragenen Längenstandard aus DNA-Fragmenten

bekannter Größe bzw. durch Vergleich der Laufweite der verschiedenen Amplifikate kann die Größe der PCR-Produkte bestimmt werden.

Die Größe der Amplifikate der HLA-Klasse I Loci liegen für HLA-A (Exon 2 und 3) bei 370 bp bzw. 350 bp, für HLA-B (Exon 2 und 3) bei 380 bp und 330 bp und für das Exon 2 und 3 des HLA-C bei 330 bp und 340 bp.

Bei den HLA-Klasse-II-Loci liegen die Banden von DPB1 bei 350 bp, von DQB1 bei 310, bzw. 280 bp (Exon 2 und 3) und von DRB1 bei 280 bp.

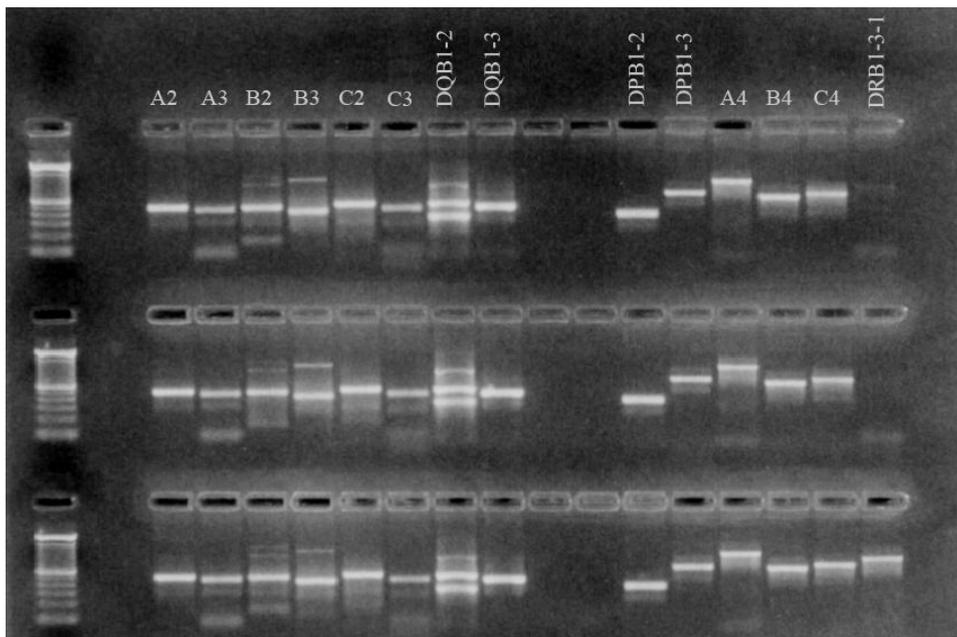


Abbildung 4.2-1-Gelelektrophorese zum Nachweis der Amplifikation

Dargestellt ist eine Gelkontrolle von drei DNA-Proben. Von links nach rechts sind die Amplifikationsbanden von HLA-A, Exon 2, Exon 3, HLA-B, Exon 2, Exon 3, HLA-C, Exon 2, Exon 3 und HLA-DQB1, Exon 2, Exon 3 sichtbar. Rechts daneben befinden sich die Amplifikationsbanden von HLA-A, Exon 4, HLA-B, Exon 4, HLA-C Exon 4 und HLA-DRB1 Exon 3.

Zur Herstellung der Agarosegele wurden 5 g Agarose in 150 ml 1x TBE-Laufpuffer durch Erhitzen in einem Mikrowellenherd gelöst. Dann wurden den 150 ml Gel 4 Tropfen Ethidiumbromid zugesetzt und nach Abkühlung auf 55°C in einen Gelträger mit eingesetzten Probekämmen gegossen.

Aus dem erstarrten Agarosegel wurden die Probekämme gezogen und das Gel auf den Gelträger in eine mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. In die entstandenen Taschen wurden 5 µl jedes Amplifikationsansatzes direkt auf das Agarosegel aufgetragen und eine elektrische Spannung von 180 V für 25 Minuten angelegt. Die negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle werden im elektrischen Feld durch die netzartige Gelmatrix gezogen und bewegen sich zur positiv geladenen Anode. Da sich die kleineren Moleküle

schneller durch das Gel bewegen können, wird somit die Auftrennung der DNA-Fragmente ihrer Größe nach möglich. Nach abgeschlossener Elektrophorese kann das Gel schließlich unter einer UV-Lampe betrachtet werden um die DNA-Banden sichtbar zu machen. Das Ethidiumbromid lagert sich in die DNA ein (Interkalation) und fluoresziert im UV-Licht.

Für die vorliegende Arbeit wurden die Gelkontrollen der Amplifikation mit dem Gel-Doc System (Bio Rad) zur Dokumentation photographiert und beschriftet. Die restlichen 15 µl der jeweiligen Amplifikationsreaktion wurden zur Aufreinigung verwendet.

4.2.5 Reinigung der Amplifikate

Da überschüssige d’NTP’s und PCR-Primer die Sequenzierreaktion beeinträchtigen können, wurden die PCR-Produkte mit Ampure Magnetic Beads der Firma Agencourt (Bioscience Beckmann Coulter) gereinigt.

Dazu wurden die Amplifikate mit jeweils 30 µl Magnetic Beads gemischt, 5-10 Minuten in eine 96 Well Magnetplatte gestellt und die überschüssigen Primer- und d’NTP’s abgesaugt. Anschließend wurde das Amplifikat mit 70%-igem Ethanol 2 x gewaschen und getrocknet. Zum Resuspendieren der DNA wurden die Beads in 50 µl HPLC-Wasser gemischt. Danach wurden die Proben 5 Minuten in eine 96 Well Magnetplatte gestellt.

4.2.6 Sequenzier-Polymerasekettenreaktion (Cycle-Sequencing)

Die Sequenzierung wurde mithilfe des Big Dye Terminator Kits durchgeführt. Der Cycle Sequenzierreaktion liegt das Prinzip des Kettenabbruchs nach Sanger zu Grunde. Das Big Dye Terminator Kit enthält zusätzlich zu den Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) Didesoxynukleotide ddNTP, die fluoreszenzmarkiert sind. Werden diese fluoreszierenden Nukleotide während der PCR in den replizierten Strang eingebaut, kommt es zu einem Kettenabbruch, da das freie 3’OH-Ende fehlt und somit keine Phosphodiesterbindung gebildet werden kann. Durch die richtige Mischung von Nukleotiden und Stopnukleotiden wird erreicht, dass die Reaktion „zufällig“ zum Stehen kommt und alle theoretisch möglichen Sequenzfragmente dargestellt werden.

Es entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge, die am 3’-Ende mit unterschiedlichen Farbstoffen fluoreszenzmarkiert sind, je nachdem welches ddNTP eingebaut wurde.

Die Amplifikate wurden jeweils in beiden Richtungen (sense und reverse) sequenziert. In dem Nachfolgenden sind die Pipettierarbeitsschritte zur Herstellung des Sequenzieransatzes in Tabellen zusammengefasst.

Mix	Zusammensetzung	Gesamtvolumen
20x PCR-Lösung	10 µl H ₂ O 20 µl Puffer 10x 10 µl Big Dye 40 µl Q-Solution	
		80 µl

Tabelle 4.2-3-Zusammensetzung der 20x PCR-Lösung für den Sequenzieransatz

	Zusammensetzung pro Ansatz	Gesamtvolumen
Sequenzieransatz	2 µl H ₂ O 4 µl 20x PCR-Lösung 2 µl Primer (forward bzw. reverse, siehe 3.3.2) 2 µl Template (PCR-Produkt)	
		10 µl

Tabelle 4.2-4-Zusammensetzung des Sequenzieransatzes pro Tube

4.2.7 Reinigung des Sequenzieransatzes mit Clean-Seq Beads

Auch die Sequenzierprodukte müssen, bevor sie mit dem Sequenzierer analysiert werden, gereinigt werden. Für diese Arbeit wurde die Reinigung mit CleanSEQ beads (Agencourt Bioscience) gemäß Herstellerangaben mithilfe eines Pipettierroboters durchgeführt. Die Reinigung gliedert sich in folgende Pipettierschritte:

- 1) 10 µl CleanSEQ Beads-Lösung und 42 µl 85% Ethanol wurden zu jeder Probe hinzupipettiert und mit der Pipette sorgfältig gemischt.
- 2) Proben wurden 5 Minuten in eine 96 Well Magnetplatte gestellt und anschließend der Überstand abgesaugt.
- 3) Mit 100 µl 85% Ethanol pro Probe wurde das Produkt zweimal gewaschen. Der Ethanol durfte jeweils erst nach 30 Sekunden Einwirkdauer abgesaugt werden.
- 4) Proben wurden zum Trocknen 10 Minuten ohne Magnetplatte bei Raumtemperatur stehen gelassen.

- 5) Die DNA wurde anschließend mit 80 µl HPLC Wasser pro Probe eluiert und mit 20 µl Decköl überschichtet.

4.2.8 Sequenzierung mithilfe des ABI 3130xl Genetic Analyzer

Die Aufarbeitung und Auftrennung der Proben wurde mithilfe eines DNA-Kapillar-Sequenzierers (ABI 3130xl Genetic Analyzer) durchgeführt. Bei der Kapillarsequenzierung wird die Auftrennung der unterschiedlich langen Sequenzierungsprodukte in einer Kapillare, die mit einem speziellen Polymer gefüllt ist, unter sehr hohen Spannungen erreicht. Nach der Auftrennung erfolgt die Anregung der vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe über Laserabtastung. Die emittierten Farbsignale werden über Filter mit vier verschiedenen Wellenlängen in einem Fotomultiplier geleitet und mit Hilfe eines Computers in die entsprechende Nukleotidsequenz übersetzt. Die Feinauswertung der Rohdaten erfolgte mit dem Programm uTYPE der Firma Invitrogen.

4.3 Statistische Auswertung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Autoimmunerkrankung Pemphigoid gestationis und der HLA-Haplotypen bei den betroffenen Patientinnen, ihren Partnern und Kindern untersucht. Dazu wurden die Typisierungsergebnisse des Patientenkollektivs mit Typisierungsdaten unverwandter Thrombozytenspender als Kontrollgruppe verglichen.

Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung stand nur ein 45 DNA-Proben umfassendes Patientenkollektiv zur Verfügung. Trotz hochauflösender 4 digit Typisierung wurden für die statistischen Berechnungen wegen der geringen Patientenzahl bis auf den DPB1-Locus nur 2-digit Ergebnisse verwendet.

Für die Ermittlung der Assoziationsstärke wurden berechnete Allel- und Phänotypfrequenzen der jeweiligen Gruppen mit dem Exakten Test nach Fischer verglichen.

Die Genfrequenz, die in dieser Arbeit mit der Allelfrequenz gleichzusetzen ist, berechnet sich nach der Formel:

$$f = n_a / n_g$$

Dabei ist n_a die Anzahl eines Merkmals oder Allels, n_g die Gesamtzahl aller Merkmale bzw. Allele. Dabei wird vorausgesetzt, dass ein Individuum, das nur ein Allel aufweist, für dieses Allel homozygot ist. Da jede Person die beiden Allele des HLA-Locus kodominant exprimiert gilt: $N_{\text{Gene}} = 2N_{\text{Individuen}}$

Bei den Berechnungen des Signifikanzniveaus wurden Werte mit $p > 0,05$ als nicht signifikant, Werte mit $p \leq 0,05$ als signifikant, Werte mit $p \leq 0,01$ als sehr signifikant und Werte mit $p \leq 0,001$ als höchst signifikant bezeichnet. Aufgrund des kleinen Patientenkollektivs wurde keine Korrektur des p-Wertes nach Yates vorgenommen.

5. Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der HLA-Kompletttypisierung

Für die HLA-Kompletttypisierung des Patientenkollektivs (PG-Patientinnen, Väter und Kinder) wurden zunächst die entsprechenden Exons der HLA-Klasse-I- und II-Gene amplifiziert und im Anschluss eine Cycle Sequencing PCR durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte mithilfe eines DNA-Kapillar-Sequenziergerätes (ABI 3130xl Genetic Analyzer). Für die Feinauswertung der Rohdaten wurde das Programm uTYPE der Firma Invitrogen verwendet. Die genauen PCR- und Sequenzierbedingungen können dem Kapitel 4.2 entnommen werden. Die verwendeten DNA-Proben stammten zum Teil aus den Beständen der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität München, zum Teil wurden sie im Rahmen dieser Doktorarbeit mithilfe des QIAamp Blood Midi Kit (Qiagen) isoliert.

Die Ergebnisse der Typisierung wurden hinsichtlich der Allel- und Phänotypfrequenz untersucht und mit einer Kontrollgruppe mithilfe des Exakten Tests nach Fischer verglichen. Eine Übersicht der in dem Patientenkollektiv (PG-Patientinnen und Väter) gefundenen einzelnen HLA-Merkmale von den ausgewählten Loci ist in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

Bei den PG-Patientinnen wurden folgende Ergebnisse ermittelt:

Genlocus	PG-Patientinnen n=36	Allelfrequenz PG-Pat.%	Kontrolle weiblich, n=728	Allelfrequenz Kontrolle %	PG-Pat./Kontrolle Fischer p-Wert
A*01	8	22,22	113	15,52	0.3460
A*11	4	11,11	37	5,08	0.1208
A*02	6	16,67	199	27,34	0.1813
A*03	3	8,33	122	16,76	0.2485
A*32	3	8,33	28	3,85	0.1749
A*68	2	5,56	29	3,98	0.6528
sonstige	10				

Tabelle 5.1-1-Auswertung des HLA-A-Locus des PG-Patientinnen-Kollektivs

Allelfrequenzen für die gefundenen HLA-A-Allele bei den PG-Patientinnen. Unter sonstige sind nur einmal im PG-Patientinnen-Kollektiv auftretende HLA-A-Allele zusammengefasst. Da die beiden HLA-A-Allele kodominant exprimiert werden, sind die Fallzahlen verdoppelt.

Genlocus	PG-Patientinnen n=36	Allelfrequenz PG-Pat. %	Kontrolle weiblich, n=728	Allelfrequenz Kontrolle %	PG-Pat./Kontrolle Fischer p-Wert
B*08	10	27,78	68	9,34	0,0019, v. sig.
B*18	4	11,11	39	5,36	0,0455, sig.
B*49	2	5,56	16	2,20	0,0481, sig.
B*37	2	5,56	16	2,20	0,0481, sig.
B*38	2	5,56	26	3,57	0,1402
B*51	4	11,11	46	6,32	0,2862
B*44	3	8,33	80	10,99	0,7879
B*15	2	5,56	42	5,77	1
sonstige	7				

Tabelle 5.1-2-Auswertung des HLA-B-Locus des PG-Patientinnen-Kollektivs

Allelfrequenzen für die gefundenen HLA-B-Allele bei den PG-Patientinnen. Unter sonstige sind nur einmal im PG-Patientinnen-Kollektiv auftretende HLA-B-Allele zusammengefasst. Da die beiden HLA-B-Allele kodominant exprimiert werden, sind die Fallzahlen verdoppelt.

Genlocus	PG-Patientinnen n=36	Allelfrequenz PG-Pat. %	Allelfrequenz Kontrollkollektiv % NMDP Datenbank	PG-Pat./Kontrolle Fischer p-Wert
C*07	14	22	33,19	0.5768
C*04	2	34	10,5	0.5566
C*05	2	34	9,4	1
C*03	3	33	13,6	0.5993
C*14	2	34	1,03	0.0908
sonstige	13			

Tabelle 5.1-3-Auswertung des HLA-C-Locus des PG-Patientinnen-Kollektivs

Allelfrequenzen für die gefundenen HLA-C-Allele bei den PG-Patientinnen. Unter sonstige sind nur einmal im PG-Patientinnen-Kollektiv auftretende HLA-C-Allele zusammengefasst. Da die beiden HLA-C-Allele kodominant exprimiert werden, sind die Fallzahlen im Patientenkollektiv verdoppelt. Die Allelfrequenz der Kontrollgruppe ist der NMDP-Datenbank entnommen.

Genlocus	PG-Patientinnen n=36	Allelfrequenz PG-Pat. %	Kontrolle weiblich, n=728	Allelfrequenz Kontrolle %	PG-Pat./Kontrolle Fischer p-Wert
DRB1*03	12	33,33	67	9,20	0.0001 extr. sig
DRB1*04	7	19,44	78	10,71	0.1064
DRB1*15	2	5,56	130	17,86	0.0684
DRB1*16	2	5,56	18	2,47	0.2419
DRB1*13	3	8,33	105	14,42	0.3299
DRB1*01	2	5,56	77	10,58	0.4078
DRB1*11	3	8,33	81	11,13	0.7878
sonstige	5				

Tabelle 5.1-4-Auswertung des HLA-DRB1-Locus des PG-Patientinnen-Kollektivs

Allelfrequenzen für die gefundenen HLA-DRB1-Allele bei den PG-Patientinnen. Unter sonstige sind nur einmal im PG-Patientinnen-Kollektiv auftretende HLA-DRB1-Allele zusammengefasst. Da die beiden HLA-DQB1-Allele kodominant exprimiert werden, sind die Fallzahlen verdoppelt.

Genlocus	PG-Patientinnen n=36	Allelfrequenz PG-Pat.%	Kontrolle weiblich, n=728	Allelfrequenz Kontrolle %	PG-Pat./Kontrolle Fischer p-Wert
DQB1*02	12	33,33	131	17,99	0.0283, sig.
DQB1*06	7	19,44	218	29,95	0.1955
DQB1*05	6	16,67	126	17,31	0.8209
DQB1*03	10	27,78	220	30,22	0.8536
sonstige	1				

Tabelle 5.1-5-Auswertung des HLA-DQB1-Locus des PG-Patientinnen-Kollektivs

Allelfrequenzen für die gefundenen HLA-DQB1-Allele bei den PG-Patientinnen. Unter sonstige sind nur einmal im PG-Patientinnen-Kollektiv auftretende HLA-DQB1-Allele zusammengefasst. Da die beiden HLA-DQB1-Allele kodominant exprimiert werden, sind die Fallzahlen verdoppelt.

Genlocus	PG-Patientinnen n=36	Allelfrequenz PG-Pat.%	Allelfrequenz Kontrolle % Allele frequency Datenbank	PG-Pat./Kontrolle Fischer p-Wert
DPB1*0101	7	19,44	5,4	0.0061 v. sig
DPB1*0401	11	30,56	39,8	0.3696
DPB1*0402	5	13,89	10,1	0.4012
DPB1*04	16	44,44	49,9	0.6008
DPB1*0201	7	19,44	15,5	1
DPB1*0301	3	8,33	12,1	1
sonstige	3			

Tabelle 5.1-6-Auswertung des HLA-DPB1-Locus des PG-Patientinnen-Kollektivs

Allelfrequenzen für die gefundenen HLA-DPB1-Allele bei den PG-Patientinnen. Unter sonstige sind nur einmal im PG-Patientinnen-Kollektiv auftretende HLA-DPB1-Allele zusammengefasst. Da die beiden HLA-DPB1-Allele kodominant exprimiert werden, sind die Fallzahlen verdoppelt. Als Kontrollkollektiv diente hier das „Essen Germany“ Kollektiv der Datenbank Allele frequencies (siehe 3.1.2).

Genlocus	PG-Patientinnen n=36	Allelfrequenz PG-Pat.%	Allelfrequenz Kontrolle% Allele frequency Datenbank	PG-Pat./Kontrolle Fischer p-Wert
DPB1*0101	7	19,44	3,9	0.0011, v. sig
DPB1*0401	11	30,56	40,3	0.2893
DPB1*0402	5	13,89	13,8	1
DPB1*04	16	44,44	54,1	0.2981
DPB1*0201	7	19,44	11,9	0.1906
DPB1*0301	3	8,33	13,8	1
sonstige	3			

Tabelle 5.1-7- Auswertung des HLA-DPB1-Locus des PG-Patientinnen-Kollektivs

Allelfrequenzen für die gefundenen HLA-DPB1-Allele bei den PG-Patientinnen. Unter sonstige sind nur einmal im PG-Patientinnen-Kollektiv auftretende HLA-DPB1-Allele zusammengefasst. Da die beiden HLA-DPB1-Allele kodominant exprimiert werden, sind die Fallzahlen verdoppelt. Als Kontrollkollektiv diente hier das Pop 2 Germany Kollektiv der Datenbank Allele frequencies (siehe 3.1.2).

Bei der Auswertung des HLA-A und C-Locus ergaben sich bezüglich der Allelfrequenzen unter Verwendung des Exakten Tests nach Fischer keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen dem Kollektiv der PG Patientinnen und dem weiblichen Kontrollkollektiv (sämtliche p-Werte sind $>0,05$, siehe Tabelle 5.1.1 und 5.1.3). Die Allelfrequenzen der ermittelten Allele des HLA-B-Locus ergaben eine statistisch signifikante Häufung des HLA-B*08-Allels ($p=0,0019$) und eine eventuell signifikante Häufung des HLA-B*49 und B*37-Allels ($p=0,0481$). Bei den letzten beiden muss beachtet werden, dass die beiden Allele jeweils nur zweimal in dem kleinen PG-Patientinnen Kollektiv vorkommen. Die bekannte Assoziation von PG mit dem HLA-DRB1*03-Allel konnte bei diesen Typisierungsergebnissen bestätigt werden ($p=0,0001$). Die in früheren Studien beschriebene Assoziation mit dem HLA-DRB1*04-Allel konnte bei dieser Untersuchung nicht gezeigt werden. Die Auswertung der Allele des HLA-DQB1 und DPB1-Locus zeigte eine signifikante Häufung in Bezug auf das Auftreten des HLA-DQB1*02-Allels ($p=0,0283$) und des DPB1*0101-Allels ($p=0,0011$ bzw. $p=0,0061$, je nach Kontrollkollektiv).

Die Häufung der HLA-B*08, DRB1*03 und DQB1*02-Allele weist auf ein mögliches Kopplungsungleichgewicht der Allele hin. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Nanda et al (Nanda, Al-Saeed et al. 2003) waren in dem 18 PG-Patientinnen umfassenden Kollektiv alle 10 DRB1*03-Träger auch positiv in Bezug auf das DQB1*02-Allel. Ein weniger starkes Kopplungsungleichgewicht war zwischen HLA-B*08 und HLA-DRB1*03 und HLA-DQB1*02 vorhanden. Insgesamt waren 8 PG-Patientinnen Träger des HLA-B*08-Allels. 7 der 8 Trägerinnen wurden auch als Träger des HLA-DRB1*03 und HLA-DQB1*02-Allels identifiziert. Auch für das HLA-DPB1*0101-Allel wurden Kopplungsungleichgewichte mit DRB1*03 beschrieben. In diesem Patientenkollektiv waren 4 der 5 DPB1*0101-Phänotypen (siehe Tabelle 5.1.11) auch Träger des DRB1*03-Allels.

Zur weiteren Überprüfung der Assoziation des PG mit den signifikant gehäuft auftretenden HLA-Allelen dieser Untersuchung wurden die Phänotypfrequenzen der betroffenen Allele errechnet. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

Phänotyp	PG-Patientinnen n=18	Phänotypfrequenz PG-Pat. %	Kontrolle weiblich, n=364	Phänotypfrequenz Kontrolle %	PG-Pat./Kontrolle Fischer p-Wert
B*08	8	44,44	30	8,24	0,0001 extr. sig.
B*18	3	16,67	38	10,44	0,4255

Tabelle 5.1-8-Phänotypfrequenzen ausgewählter HLA-B-Phänotypen

Phänotyp	PG-Patientinnen n=18	Phänotypfrequenz PG-Pat. %	Kontrolle weiblich, n=364	Phänotypfrequenz Kontrolle %	PG-Pat./Kontrolle Fischer p-Wert
DRB1*03	10	55,56	64	17,6	0,0005 extr. sig.
DRB1*04	7	38,89	75	20,60	0,0782
DRB1*03/04	4	22,22	7	1,92	0,0009 extr. sig.

Tabelle 5.1-9-Phänotypfrequenzen ausgewählter HLA-DRB1-Phänotypen

Phänotyp	PG-Patientinnen n=18	Phänotypfrequenz PG-Pat. %	Kontrolle weiblich, n=364	Phänotypfrequenz Kontrolle %	PG-Pat./Kontrolle Fischer p-Wert
DQB1*02	10	55,56	121	33,24	0,0726

Tabelle 5.1-10-Phänotypfrequenz des HLA-DQB1*02 Phänotyps

Phänotyp	PG-Patientinnen n=18	Phänotypfrequenz PG-Pat. %	Phänotypfrequenz Kontrolle %	PG-Pat./Kontrolle Fischer p-Wert
DPB1*0101	5	27,78	10,30	0,0456

Tabelle 5.1-11-Phänotypfrequenz des HLA-DPB1*0101 Phänotyps

Die Phänotypfrequenz wurde der Datenbank Allele frequencies entnommen (Germany Essen-Kollektiv)

Die Auswertung der Phänotypfrequenzen ergab im Vergleich zu den Allelfrequenzen eine statistisch signifikantere Häufung des HLA-B*08-Phänotyps ($p=0,0001$, im Vergleich zu $p=0,0019$ bei der Allelfrequenz). Der HLA-B*18-Phänotyp wies im Gegensatz zu der Allelfrequenz keine signifikante Häufung in dem PG-Patientinnen Kollektiv auf. Die Berechnungen der ausgewählten DRB1-Phänotypen zeigten in Übereinstimmung mit den

statistischen Ergebnissen der Allelfrequenzen eine hoch signifikante Häufung des DRB1*03-Phänotyps ($p=0,0005$). Die in früheren Studien beschriebene Häufung des kombinierten HLA-DRB1*03/*04-Phänotyps bei den PG-Patientinnen ist auch bei den Typisierungsergebnissen dieser Arbeit deutlich erkennbar ($p=0,0009$). In der Literatur wird die Frequenz dieses kombinierten Phänotyps in der Normalbevölkerung mit $<3\%$ angegeben. In dem Kollektiv der PG-Patientinnen lag die Phänotypfrequenz des HLA-DRB1*03/*04 Typs bei 22,2% (siehe Tabelle 5.1.9). In Bezug auf das Auftreten des HLA-DQB1*02-Phänotyps waren keine statistisch signifikanten Abweichungen von dem Kontrollkollektiv feststellbar.

Die statistische Auswertung der Typisierungsergebnisse der 13 DNA Proben der Partner der PG-Patientinnen sind ebenfalls tabellarisch dargestellt.

Genlocus	PG-Väter n=26	Allelfrequenz PG-Väter %	Kontrolle männlich, n=766	Allelfrequenz Kontrolle %	PG- Väter./Kontrolle Fischer p-Wert
A*02	7	26,92	218	28,46	1
A*03	6	23,08	105	13,71	0.2429
A*01	3	11,54	102	13,32	1
A*11	2	7,69	44	5,74	0.3931
A*25	2	7,69	17	2,22	0.0215, sig.
sonstige	6				

Tabelle 5.1-12-Auswertung des HLA-A-Locus des Kollektivs der Partner der PG-Patientinnen

Allelfrequenzen für die gefundenen HLA-A-Allele bei den Partnern der PG-Patientinnen. Unter sonstige sind nur einmal im Kollektiv auftretende HLA-A-Allele zusammengefasst. Da die beiden HLA-A-Allele kodominant exprimiert werden, sind die Fallzahlen verdoppelt.

Genlocus	PG-Väter n=26	Allelfrequenz PG-Väter %	Kontrolle männlich, n=766	Allelfrequenz Kontrolle %	PG- Väter./Kontrolle Fischer p-Wert
B*44	5	19,23	105	13,71	0.3902
B*07	4	15,38	78	10,18	0.3340
B*15	3	11,54	65	8,49	0.4825
B*18	3	11,54	45	5,87	0.2047
B*35	3	11,54	71	9,27	0.7271
B*51	2	7,69	42	5,48	0.6507
sonstige	6				

Tabelle 5.1-13- Auswertung des HLA-B-Locus des Kollektivs der Partner der PG-Patientinnen

Allelfrequenzen für die gefundenen HLA-B-Allele bei den Partnern der PG-Patientinnen. Unter sonstige sind nur einmal im Kollektiv auftretende HLA-B-Allele zusammengefasst. Da die beiden HLA-B-Allele kodominant exprimiert werden, sind die Fallzahlen verdoppelt.

Genlocus	PG-Väter n=26	Allelfrequenz PG-Väter %	Allelfrequenz Kontrolle % NMDP Datenbank	PG- Väter./Kontrolle Fischer p-Wert
C*07	6	23,08	33,20%	0.3836
C*04	6	23,08	10,50%	0.1007
C*05	2	7,69	7,70%	1
C*03	4	15,38	40,70%	0.7685
C*06	3	11,54	9,20%	0.7248
C*01	2	7,69	2,90%	0.2157
sonstige	3			

Tabelle 5.1-14-Auswertung des HLA-C-Locus des Kollektivs der Partner der PG-Patientinnen

Allelfrequenzen für die gefundenen HLA-C-Allele bei den Partnern der PG-Patientinnen. Unter sonstige sind nur einmal im Kollektiv auftretende HLA-C-Allele zusammengefasst. Da die beiden HLA-C-Allele kodominant exprimiert werden, sind die Fallzahlen des Patientenkollektivs verdoppelt. Die Allelfrequenz des Kontrollkollektivs ist der Datenbank des NMDP entnommen.

Genlocus	PG-Väter, n=26	Allelfrequenz PG-Väter %	Kontrolle männlich, n=766	Allelfrequenz Kontrolle %	PG- Väter./Kontrolle Fischer p-Wert
DQB1*03	7	26,92	265	34,60	0.5305
DQB1*06	7	26,92	185	24,15	0.8159
DQB1*02	5	19,23	157	20,50	1
DQB1*05	5	19,23	132	17,23	0.7920
DQB1*04	2	7,69	25	3,26	0.2208

Tabelle 5.1-15- Auswertung des HLA-DQB1-Locus des Kollektivs der Partner der PG-Patientinnen

Allelfrequenzen für die gefundenen HLA-DQB1-Allele bei den Partnern der PG-Patientinnen. Unter sonstige sind nur einmal im Kollektiv auftretende HLA-DQB1-Allele zusammengefasst. Da die beiden HLA-DQB1-Allele kodominant exprimiert werden, sind die Fallzahlen verdoppelt.

Genlocus	PG-Väter n=26	Allelfrequenz PG-Väter %	Kontrolle männlich, n=766	Allelfrequenz Kontrolle %	PG- Väter./Kontrolle Fischer p-Wert
DRB1*15	6	23,08	89	11,62	0.1137
DRB1*16	2	7,69	18	2,35	0.1372
DRB1*04	3	11,54	99	12,92	1
DRB1*11	3	11,54	102	13,32	1
DRB1*13	2	7,69	109	14,23	0.5635
DRB1*08	2	7,69	27	3,52	0.2457
DR02 (DRB1*15 /16)	8	30,77	107	13,97	0.0405, sig.
sonstige	8				

Tabelle 5.1-16- Auswertung des HLA-DRB1-Locus des Kollektivs der Partner der PG-Patientinnen

Allelfrequenzen für die gefundenen HLA-DRB1-Allele bei den Partnern der PG-Patientinnen. Unter sonstige sind nur einmal im Kollektiv auftretende HLA-DRB1-Allele zusammengefasst. Da die beiden HLA-DRB1-Allele kodominant exprimiert werden, sind die Fallzahlen verdoppelt.

Genlocus	PG-Väter n=26	Allelfrequenz PG-Väter%	Allelfrequenz Kontrolle % n=348	PG- Väter./Kontrolle Fischer p-Wert
DPB1*0401	7	26,92	39,8	0.2180
DPB1*0402	5	19,23	10,1	0.1767
DPB1*04	12	46,15	49,9	0.8394
DPB1*0201	3	11,54	15,5	0.4371
DPB1*1001	2	7,69	0,6	0.0253, sig
DPB1*0301	2	7,69	12,1	0.7534
DPB1*1701	2	7,69	1,4	0.0779
DPB1*1401	2	7,69	1,4	0.0779
sonstige	3			

Tabelle 5.1-17-Auswertung des DPB1-Locus des Kollektivs der Partner der PG-Patientinnen

Allelfrequenzen für die gefundenen HLA-DPB1-Allele bei den Partnern der PG-Patientinnen. Unter sonstige sind nur einmal im Kollektiv auftretende HLA-DPB1-Allele zusammengefasst. Da die beiden HLA-DPB1-Allele kodominant exprimiert werden, sind die Fallzahlen verdoppelt. Als Kontrollkollektiv diente hier das „Essen Germany“ Kollektiv der Datenbank Allele frequencies (siehe 3.1.2).

Genlocus	PG-Väter n=26	Allelfrequenz PG-Väter%	Allelfrequenz Kontrolle % n=348	PG- Väter./Kontrolle Fischer p-Wert
DPB1*0401	7	26,92	40,3	0.2167
DPB1*0402	5	19,23	13,8	0.3937
DPB1*04	12	46,15	54,1	0.5438
DPB1*0201	3	11,54	11,9	1
DPB1*1001	2	7,69	2,4	0.1551
DPB1*0301	2	7,69	13,8	0.5558
DPB1*1701	2	7,69	1,7	0.0943
DPB1*1401	2	7,69	1	0.0439, sig
sonstige	3			

Tabelle 5.1-18- Auswertung des DPB1-Locus des Kollektivs der Partner der PG-Patientinnen

Allelfrequenzen für die gefundenen HLA-DPB1-Allele bei den Partnern der PG-Patientinnen. Unter sonstige sind nur einmal im Kollektiv auftretende HLA-DPB1-Allele zusammengefasst. Da die beiden HLA-DPB1-Allele kodominant exprimiert werden, sind die Fallzahlen verdoppelt. Als Kontrollkollektiv diente hier das Pop 2 Germany Kollektiv der Datenbank Allele frequencies (siehe 3.1.2).

Phänotyp	PG-Väter n=13	Phänotypfrequenz PG-Väter %	Kontrolle männlich n=383	Phänotypfrequenz Kontrolle %	PG- Väter./Kontrolle Fischer p-Wert
DR02 (DRB1*15 /16)	7	53,85	102	26,63	0.0518

Tabelle 5.1-19-Phänotypfrequenz für den DRB1*02 Phänotyp im Kollektiv der Partner der PG-Patientinnen

Eine eventuell signifikante Häufung in Bezug auf die Allelfrequenz wurde für das A*25-Allel ermittelt ($p=0,0215$), wobei dieses Allel nur zweimal im gesamten Kollektiv der Partner der

PG-Patientinnen auftrat. Die statistischen Ergebnisse der Auswertung des HLA-B, C DQB1 und DPB1-Locus wiesen keine signifikanten Abweichungen von dem Kontrollkollektiv auf. Der Vergleich der Allelfrequenzen des DRB1-Locus mithilfe des Exakten Tests nach Fischer ergab ebenfalls keine statistisch signifikanten Abweichungen vom Kontrollkollektiv. Die Allelfrequenz von DRB1*02 insgesamt d.h. die Summe aus den Allelfrequenzen von DRB1*15 und 16, lässt eine eventuelle signifikante Häufung vermuten ($p=0,0518$). Wie von Yancey und Shornick et al. beschrieben waren etwa die Hälfte (53,85%) aller Partner der PG-Patientinnen phänotypisch DRB1*02 positiv.

5.2 Analyse der Aminosäuresequenzen typisierter HLA-Gene bei Pemphigoid gestationis Patientinnen und deren Kinder

Um zu überprüfen, ob die ermittelten HLA-Allele der PG-Patientinnen Ähnlichkeiten auf der Polypeptidebene haben, wurden die Allele mithilfe der IMGT/HLA Datenbank in die Aminosäuresequenzen übersetzt. Übersetzt wurden die polymorphen Regionen der HLA-Allele. Bei den HLA-Klasse-I-Loci umfassen diese die Aminosäurepositionen von 1-200, bei den HLA-Klasse-II-Loci die Aminosäurepositionen von 1-100. Die Aminosäuren sind in der Aufzählung in Ein-Buchstaben-Symbolen dargestellt.

Aminosäuresequenzen der DRB1-Allele des PG-Patientinnenkollektivs

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
DRB1*010101	GDTRPRFLWQ	LKFECHFFNG	TERVRLLERC	IYNQEESVRF	DSDVGEYRAV	TELGRPDAEY	WNSQKDLLEQ	RRAAVDTYCR	HNYGVGESFT	VQRRVEPKVT
DRB1*010201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----AV-----	-----	-----
DRB1*03010101	-----EY	STS-----	-----Y-D-Y	FH-----N---	-----F---	-----	-----	K-GR--N---	-----V---	-----H---
DRB1*040101	-----E-	V-H-----	-----F-D-Y	F-H---Y---	-----	-----	-----	K-----	-----	-----Y-E--
DRB1*0402	-----E-	V-H-----	-----F-D-Y	F-H---Y---	-----	-----I--D	E-----	-----	-----V---	-----Y-E--
DRB1*040301	-----E-	V-H-----	-----F-D-Y	F-H---Y---	-----	-----	---E-----	-----	-----V---	-----Y-E--
DRB1*0404	-----E-	V-H-----	-----F-D-Y	F-H---Y---	-----	-----	-----	-----	-----V---	-----Y-E--
DRB1*110101	-----EY	STS-----	-----F-D-Y	F-----Y---	-----F---	-----E--	-----F--D	-----	-----	-----H---
DRB1*1103	-----EY	STS-----	-----F-D-Y	F-----Y---	-----F---	-----E--	-----F--D	E-----	-----V---	-----H---
DRB1*110401	-----EY	STS-----	-----F-D-Y	F-----Y---	-----F---	-----E--	-----F--D	-----	-----V---	-----H---
DRB1*130101	-----EY	STS-----	-----F-D-Y	FH-----N---	-----F---	-----	-----I--D	E-----	-----V---	-----H---
DRB1*130201	-----EY	STS-----	-----F-D-Y	FH-----N---	-----F---	-----	-----I--D	E-----	-----	-----H---
DRB1*1454	-----EY	STS-----	-----F-D-Y	FH----F---	-----	-----A--H	-----R	---E-----	-----V---	-----H---
DRB1*15010101	-----	P-R-----	-----F-D-Y	F-----	-----F---	-----	-----I---	A-----	-----V---	-----Q---
DRB1*160101	-----	P-R-----	-----F-D-Y	F-----	-----	-----	-----F--D	-----	-----	-----Q---

Tabelle 5.2-1-Aminosäuresequenzen der DRB1-Allele der PG-Patientinnen

Aufgelistet ist die Aminosäuresequenz der DRB1-Allele der PG-Patientinnen von Position 1-100. Gelb markiert sind die Aminosäuren der Positionen 9, 28, 30, 31 und 86 der gefundenen DRB1*03 und *04-Allele. Alle Patientinnen wurden als Träger mindestens eines DRB1-04 oder DRB1-03 Allels oder sogar als Träger beider ermittelt.

Als Ansatzpunkt für die Analyse der Aminosäuresequenz der DRB1-Allele diene die Gemeinsamkeit aller PG-Mütter, entweder Träger eines DRB1*0301 oder eines DRB1*04-Allels oder Träger dieser beiden Allele zu sein. Die Aminosäuresequenzen der DRB1*03 und DRB1*04-Allele wurden mit den übrigen im Patientenkollektiv auftretenden Allelen verglichen. Die DRB1*03 und *04-Allele tragen als Merkmal in Position 9 die Aminosäure (AS) Glutamat (E), in Position 28 die AS Aspartat (D), in Position 30 die AS Tyrosin (Y), in Position 31 die AS Phenylalanin (F) und bis auf DRB1*0401 in Position 86 die AS Valin (V), siehe gelbe Markierung in Tabelle 5.2.1. Anschließend wurde überprüft ob die PG-Patientinnen homozygote oder heterozygote Träger dieser Merkmale sind. Die Ergebnisse sind tabellarisch zusammengefasst.

PG-Mütter						
Nr.	Vererbung	Pos. 9: E	Pos. 28: D	Pos.: 30 Y	Pos. 31: F	Pos. 86: V
195195	heterozygot	-	-	-	-	-
195174	heterozygot	-	-	-	-	-
195163	homozygot	+	+	+	+	-
195175	homozygot	+	+	+	+	-
195179	homozygot	+	+	+	+	+
195185	homozygot	+	+	+	+	+
195162	homozygot	+	+	+	+	-
195640	homozygot	+	+	+	+	+
195880	homozygot	+	+	+	+	+
195168	homozygot	+	+	+	+	+
195170	homozygot	+	+	+	+	-
195172	homozygot	+	+	+	+	-
195177	homozygot	-	+	+	+	-
195184	homozygot	-	+	+	+	-
195189	homozygot	-	+	+	+	-
195191	homozygot	+	+	+	+	-
195193	homozygot	+	+	+	+	+
195198	homozygot	-	+	+	+	-

Tabelle 5.2-2 -Auswertung der Aminosäuresequenzen der DRB1-Allele im Kollektiv der PG-Patientinnen

Dargestellt sind die Vererbungsmodi ausgewählter Aminosäurepositionen der DRB1-Genprodukte im Kollektiv der PG-Patientinnen. Als heterozygote Träger wurden PG-Mütter interpretiert, die in Bezug auf keine der untersuchten Aminosäurepositionen homozygot waren. Als homozygote Träger wurden PG-Mütter interpretiert, die mindestens in Bezug auf eine der untersuchten Aminosäurepositionen homozygot waren. Das Zeichen „-“, steht für Heterozygotie, das Zeichen „+“ für Homozygotie der entsprechenden Aminosäureposition.

16 der 18 PG-Patientinnen wurden als homozygot in Bezug auf mindestens 3 der 5 Positionen bestimmt, lediglich 2 Patientinnen waren heterozygote Träger. Diese Ergebnisse sprechen für Strukturähnlichkeiten der in dem PG-Patientinnen Kollektiv auftretenden DRB1-Allele. Es muss aber auch bedacht werden, dass im Vergleich dazu die Gruppe von DRB1-Allelen diese Kriterien nicht erfüllt, in europäischen Bevölkerungen selten sind. Dieses Merkmal tragen die

folgenden tabellarisch aufgeführten HLA-DRB1-Allele nicht. Die dazugehörigen Allelfrequenzen sind der NMDP Datenbank entnommen.

Genlocus	Allelfrequenz % NMDP-Datenbank
DRB1*01	11,74
DRB1*07	13,77
DRB1*09	0,82
DRB1*12	1,47

Tabelle 5.2-3-Allelfrequenzen von DRB1-Allelen ohne E in Pos. 9, D in Pos. 28, Y in Pos. 30, F in Pos. 31, V in Pos. 86. Die Allelfrequenzen sind der NMDP Datenbank entnommen. Allelfrequenzen für DRB1*14 waren nicht verfügbar (NA).

Um eventuelle Strukturunterschiede zwischen DRB1-Allelen von Kindern von PG-Schwangerschaften und von nicht-betroffenen Schwangerschaften (skip-pregnancies) zu überprüfen wurden dieselben Positionen der Aminosäuresequenzen untersucht und verglichen. Die Ergebnisse sind tabellarisch zusammengefasst.

PG-Kinder							
Nr.	Fam.-Nr.	Vererbung	Pos. 9: E	Pos. 28: D	Pos.30: Y	Pos. 31: F	Pos. 86: V
195166	1	homozygot	-	+	+	+	-
195188	2	homozygot	+	+	+	+	+
195187	2	homozygot	-	+	+	+	+
195688	3	homozygot	-	+	+	+	-
195181	4	homozygot	-	+	+	+	+
195183	4	heterozygot	-	-	-	-	-
195723	4	heterozygot	-	-	-	-	-
195197	5	heterozygot	-	-	-	-	-
195199	6	homozygot	-	+	+	+	+

Tabelle 5.2-4-Auswertung der Aminosäuresequenzen der DRB1-Allele im Kollektiv der Kinder aus PG Schwangerschaften.

Dargestellt sind die Vererbungsmodi ausgewählter Aminosäurepositionen der DRB1-Genprodukte im Kollektiv der PG-Kinder. Als heterozygote Träger wurden die PG-Kinder interpretiert, die in Bezug auf keine der untersuchten Aminosäurepositionen homozygot waren. Als homozygote Träger wurden PG-Kinder interpretiert, die mindestens in Bezug auf eine der untersuchten Aminosäurepositionen homozygot waren. Das Zeichen“-“, steht für Heterozygotie, das Zeichen „+“ für Homozygotie der entsprechenden Aminosäureposition.

skip-Kinder							
Nr.	Fam.-Nr.	Vererbung	Pos. 9: E	Pos. 28: D	Pos.: 30 Y	Pos. 31: F	Pos. 86: V
195165	1	homozygot	+	+	+	+	+
195167	1	homozygot	-	+	+	+	-
195703	1	homozygot	-	+	+	+	-
195704	1	homozygot	+	+	+	+	+
195705	1	homozygot	-	+	+	+	-
195689	3	homozygot	+	+	+	+	-

Tabelle 5.2-5-Auswertung der Aminosäuresequenzen der DRB1-Allele im Kollektiv der Kinder von skip-pregnancies.

Dargestellt sind die Vererbungsmodi ausgewählter Aminosäurepositionen der DRB1-Genprodukte im Kollektiv der Kinder nicht betroffener Schwangerschaften (skip-Kinder). Als heterozygote Träger wurden die skip-Kinder interpretiert, die in Bezug auf keine der untersuchten Aminosäurepositionen homozygot waren. Als homozygote Träger wurden skip-Kinder interpretiert, die mindestens in Bezug auf eine der untersuchten Aminopositionen homozygot waren. Das Zeichen“-“, steht für Heterozygotie, das Zeichen „+“ für Homozygotie der entsprechenden Aminosäureposition.

In der Gruppe der Kinder von PG-Schwangerschaften waren 5 Kinder homozygote und 3 heterozygote Träger dieser Aminosäuren. Die Kinder von sog. skip-pregnancies waren alle homozygot in Bezug auf diese Merkmale. Ein besonderer Unterschied des Verteilungsmusters dieser Aminosäuren zwischen beiden Gruppen der Kinder konnte nicht beobachtet werden.

In dem Kollektiv der PG-Mütter und Kinder wiesen die Aminosäuresequenzen des DPB1- und DQB1-Locus sowie aller typisierten HLA-Loci der Klasse I keine besonderen Gemeinsamkeiten auf.

5.3 Einteilung der HLA-B und C-Allele nach KIR-bindenden Epitopen

Die natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) exprimieren am dem Ort der Implantation killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR), die unter anderem HLA-C Moleküle auf Trophoblasten binden. Beide Gensysteme sind polymorph. Eine Assoziation bestimmter mütterlicher KIR/ fetaler HLA-C Genkombinationen mit Präeklampsien und rezidivierenden Spontanaborten wurde bereits von zwei Arbeitsgruppen beschrieben (Hiby, Walker et al. 2004; Hiby, Regan et al. 2008).

Die KIR-Liganden können in Hauptkategorien unterteilt werden. Diese Gruppen unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz der KIR-bindenden Epitope der HLA-C- und HLA-B-Moleküle. Die HLA-C-Allele werden in die Allotypen C1 und C2 eingeteilt, die meisten HLA-B-Moleküle können als Bw4 oder Bw6 positiv klassifiziert werden. Die Tabelle zeigt wie diese Gruppen definiert sind.

Ligand	Kategorie	AS-Position 77	AS-Position 80
HLA-B	Bw4	N (Asparagin)	I (Isoleucin) oder T (Threonin)
HLA-B	Bw4	N (Asparagin)	I (Isoleucin) oder T (Threonin)
HLA-B	Bw4	D (Aspartat)	T (Threonin)
HLA-B	Bw4	S (Serin)	T (Threonin)
HLA-B	Bw6	G (Glycin) oder S (Serin)	N (Asparagin)
HLA-C	C1	S (Serin)	N (Asparagin)
HLA-C	C2	A (Asparagin)	K (Lysin)

Tabelle 5.3-1-Klassifikation von Bw4, Bw6, C1 und C2

Für die vorliegende Arbeit wurden die HLA-B- und C-Allele diesen Allotypen zugeordnet, um zu untersuchen, ob Gemeinsamkeiten in Bezug auf die Klassifizierung der HLA-Klasse-I-Allele nachweisbar sind. Die Ergebnisse sind tabellarisch zusammengefasst und farblich markiert.

Die C1-Gruppe ist orange markiert, die C2-Gruppe rot, die Bw4-Spezifität grün, die Bw6-Spezifität hellblau. Die Schwangerschaften, die PG auslösten, sind durch eine gelbe Markierung der entsprechenden Kinder gekennzeichnet. Die B und C-Allele sind jeweils als Haplotypen dargestellt und jeweils mit den Buchstaben „a“, „b“, „c“ und „d“ bezeichnet.

Familie 1

Mutter	a	B*1801	C*0701
	b	B*1517	C*0701
Vater	c	B*3502	C*0401
	d	B*0702	C*0702
Tochter 1	a	B*1801	C*0701
	c	B*3502	C*0401
Sohn 2	a	B*1801	C*0701
	d	B*0702	C*0702
Sohn 3	b	B*1517	C*0701
	d	B*0702	C*0702
Tochter 4	b	B*1517	C*0701
	d	B*0702	C*0702
Sohn 5	a	B*1801	C*0701
	c	B*3502	C*0401
Tochter 6	a	B*1801	C*0701
	d	B*0702	C*0702

5.3-2- Verteilung der Allotypen Bw4, Bw6, C1 und C2 in der Familie 1

Familie 2

Mutter	a	B*0801	C*0701
	b	B*0801	C*0701
Vater	c	B*5501	C*0303
	d	B*1801	C*1203
Sohn, 1	a	B*0801	C*0701
	c	B*5501	C*0303
Sohn 2	b	B*0801	C*0701
	d	B*1801	C*1203

Tabelle 5.3-3- Verteilung der Allotypen Bw4, Bw6, C1 und C2 in der Familie 2

Familie 3

Mutter	a	B*3501	C*0401
	b	B*4402	C*0501
Vater	c	B*0702	C*0702
	d	B*1501	C*0304
Tochter, 1	a	B*3501	C*0401
	c	B*0702	C*0702
Sohn, 2	a	B*3501	C*0401
	d	B*1501	C*0304

Tabelle 5.3-4- Verteilung der Allotypen Bw4, Bw6, C1 und C2 in der Familie 3

Familie 4

Mutter	a	B*5101	C*1402
	b	B*4001	C*0304
Vater	c	B*4403	C*0401
	d	B*0702	C*0702
Sohn 1	b	B*4001	C*0304
	d	B*0702	C*0702
Tochter, 2	a	B*5101	C*1402
	c	B*4403	C*0401
Tochter, 3	a	B*5101	C*1402
	c	B*4403	C*0401

Tabelle 5.3-5- der Allotypen Bw4, Bw6, C1 und C2 in der Familie 4

Familie 5

Mutter	a	B*3801	C*1203
	b	B*0801	C*0701
Vater	c	B*5101	C*1502
	d	B*3503	C*0401
Sohn	a	B*3801	C*1203
	c	B*5101	C*1502

Tabelle 5.3-6- Verteilung der Allotypen Bw4, Bw6, C1 und C2 in der Familie 5

Familie 6

Mutter	a	B*0801	C*0701
	b	B*0801	C*0701
Vater	c	B*1501	C*0401
	d	B*4402	C*0501
Tochter, 1	a	B*0801	C*0701
	c	B*1501	C*0401
Ungeboren	a	NA	NA
	d	NA	NA

Tabelle 5.3-7- Verteilung der Allotypen Bw4, Bw6, C1 und C2 in der Familie 6

Die Typisierungsdaten des Ungeborenen Kindes der Familie 6 sind nicht vorhanden (NA).

Im Fall der dargestellten Familien war kein durchgängiges Vererbungsmuster der Merkmale C1, C2, Bw4 und Bw6 bei PG und nicht betroffenen Schwangerschaften erkennbar.

5.4 Familienstammbäume vollständiger Familien

In sechs Fällen standen DNA-Proben kompletter Familien zur Verfügung, so dass Stammbaumdiagramme mit den Ergebnissen der HLA-Typisierung in Haplotypen-Darstellung angefertigt werden konnten. Auf diese Art und Weise wurde die genetische Konstellation der HLA-Haplotypen innerhalb der Familien erfasst.

Familie 1

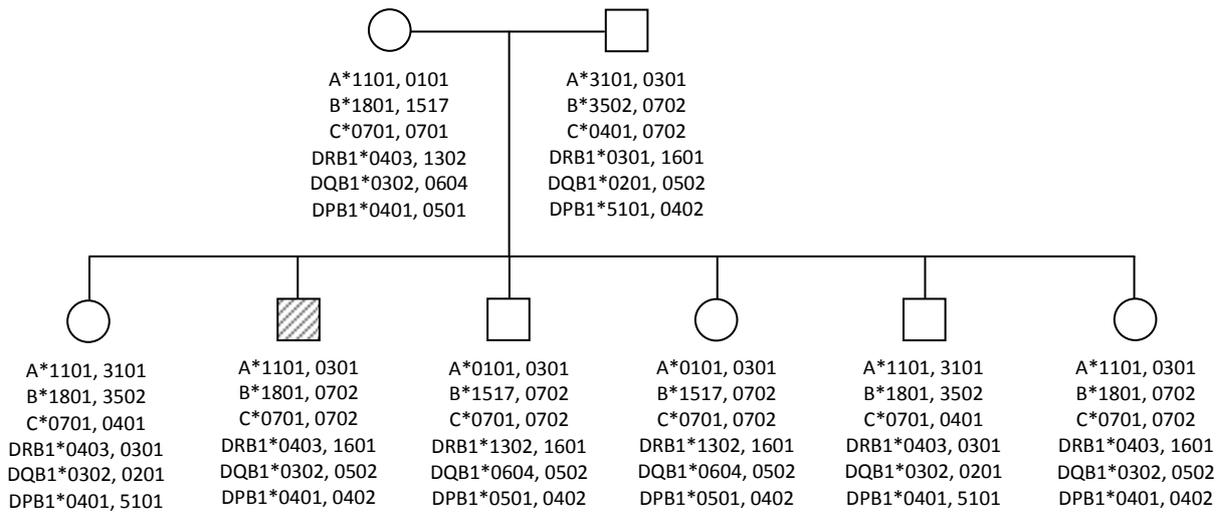


Abbildung 5.4-1-Stammbaumdiagramm der Familie 1

Dargestellt sind Mutter, Vater und Kinder (3 Söhne, 3 Töchter) der Familie. Die Geschwister sind von links nach rechts in der Reihenfolge ihrer Geburt aufgeführt. Nur die Schwangerschaft mit dem 2. Kind löste PG aus (gekennzeichnet durch die Schraffierung des Symbols). Die Ergebnisse der HLA-Typisierung sind in Haplotypen-Darstellung unter den Personensymbolen aufgelistet

Familie 2

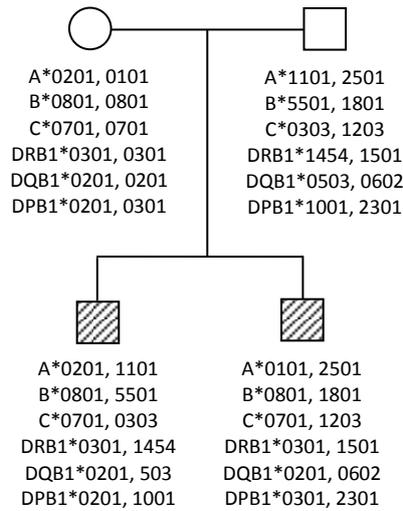


Abbildung 5.4-2-Stammbaumdiagramm der Familie 2.

Dargestellt sind Mutter, Vater und Kinder der Familie 2. Die Söhne sind in der Reihenfolge ihrer Geburt von links nach rechts aufgelistet. Beide Schwangerschaften lösten PG aus (gekennzeichnet durch die Schraffierung der Symbole). Die Ergebnisse der HLA-Typisierung sind in Haplotypen-Darstellung unter den Personen-Symbolen aufgelistet.

Familie 3

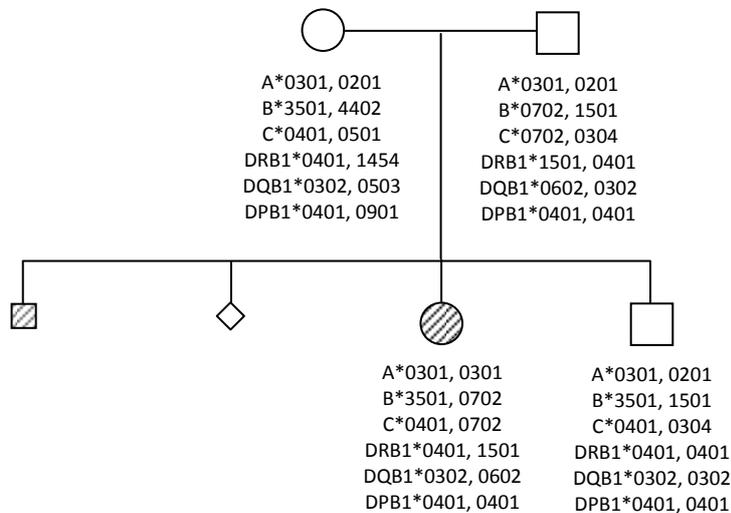


Abbildung 5.4-3-Stammbaumdiagramm der Familie 3

Dargestellt sind Mutter, Vater 2 Aborte und 2 Kinder der Familie 3. Die Aborte und Kinder sind von links nach rechts in der Reihenfolge der Schwangerschaften aufgeführt. Bei der ersten Schwangerschaft trat ein Spätabort in der 32 Schwangerschaftswoche (SSW) auf, der durch intrauterinen Fruchttod bei massiver Plazentainsuffizienz bedingt war. In der 2. Schwangerschaft trat ein Frühabort in der 7. SSW auf. Die erste als auch die 3. Schwangerschaft lösten PG aus (gekennzeichnet durch die Schraffierung der Symbole). Die Ergebnisse der HLA-Typisierung der Eltern und Kinder sind in Haplotypen-Darstellung unter den Personen-Symbolen aufgelistet.

Familie 4

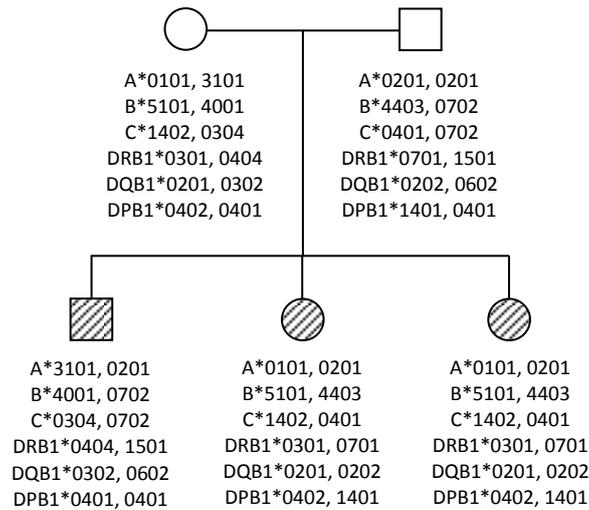


Abbildung 5.4-4-Stammbaumdiagramm der Familie 4

Dargestellt sind Mutter, Vater und drei Kinder der Familie 4. Die Geschwister sind von links nach rechts in der Reihenfolge ihrer Geburt aufgelistet. Alle drei Schwangerschaften lösten PG aus (gekennzeichnet durch die Schraffierung der Symbole). Die Ergebnisse der HLA-Typisierung sind in Haplotypen-Darstellung unter den Personen-Symbolen aufgelistet. Ist bei einem HLA-Locus nur ein Allel aufgeführt, wird davon ausgegangen, dass der Träger in Bezug auf dieses Allel homozygot ist.

Familie 5

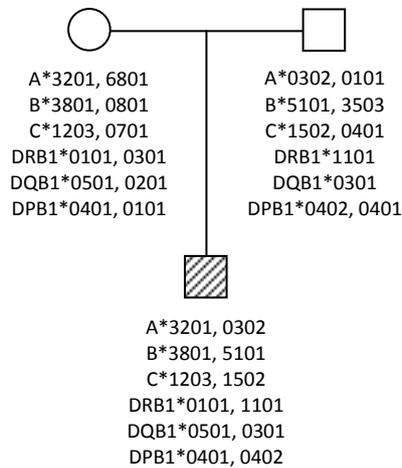


Abbildung 5.4-5-Stammbaumdiagramm der Familie 5

Dargestellt sind Mutter, Vater und Sohn der Familie 5. Die Schwangerschaft löste PG aus (gekennzeichnet durch die Schraffierung des Symbols). Die Ergebnisse der HLA-Typisierung sind in Haplotypen-Darstellung unter den Personen-Symbolen aufgelistet.

Familie 6

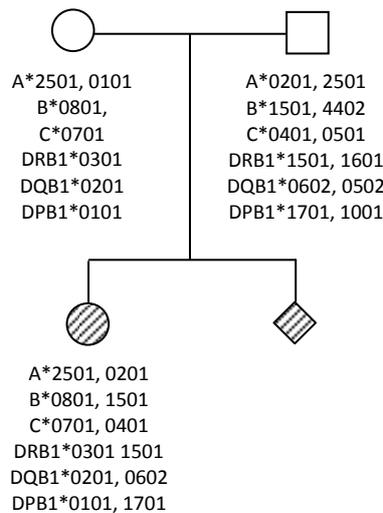


Abbildung 5.4-6- Stammbaundiagramm der Familie 6

Dargestellt sind Mutter, Vater, Tochter und ein ungeborenes Kind der Familie 6. Die Geschwister sind von links nach rechts in der Reihenfolge ihrer Geburt bzw. der Schwangerschaft aufgelistet. Beide Schwangerschaften lösten PG aus (gekennzeichnet durch die Schraffierung der Symbole). Die verfügbaren Ergebnisse der HLA-Typisierung sind in Haplotypen-Darstellung unter den Personensymbolen aufgeführt. Ist bei einem Locus nur ein Allel aufgeführt, wird davon ausgegangen, dass der Träger in Bezug auf dieses Allel homozygot ist.

Bei allen Müttern der aufgeführten Familien kann eine Assoziation der Erkrankung mit den HLA-Allelen HLA-DRB1*03 oder DRB1*04 oder einer Kombination aus HLA-DRB1*03, *04 gezeigt werden. Bei fünf der sechs Väter kann die bekannte Assoziation mit dem HLA-DRB1*02-Allel (DRB1*15 und 16) beobachtet werden.

Um auf die Genkonstellationen zu schließen, die bei der Initiierung der Erkrankung eine Rolle spielen, ist ein Vergleich der ersten betroffenen Schwangerschaft mit der -falls vorhanden- vorherigen nicht-betroffenen Schwangerschaft nötig. Ein besonderes Augenmerk muss auch auf die Genkonstellationen bei skip-pregnancies gerichtet werden.

In der Familie 1 ist das Auftreten der Erkrankung sehr untypisch. Nur die zweite der sechs Schwangerschaften war durch das PG kompliziert. Die Inzidenz von skip-pregnancies ist in der Literatur mit ca. 8% angegeben (Holmes, Black et al. 1983; Jenkins, Hern et al. 1999), folglich sind vier rezidivfreie Schwangerschaften in Folge sehr ungewöhnlich. Bemerkenswerterweise tritt das PG in der Schwangerschaft auf, bei der der väterliche Haplotyp mit dem HLA-DRB1*02-Allel an das Kind vererbt wurde.

Überraschend ist jedoch, dass die letzte Schwangerschaft der Mutter der Familie 1 rezidivfrei blieb obwohl dieses Kind und der zweite Sohn HLA-identisch sind.

Die Vererbung des väterlichen HLA-DRB1*02 Haplotypen und das Auftreten des PG in der entsprechenden Schwangerschaft kann auch bei der Familie 4 und 6 beobachtet werden.

Dieses Phänomen ist bei der Familie 3 nicht beurteilbar, da die erste Schwangerschaft, die auch durch das PG kompliziert wurde, mit einem intrauterinen Fruchttod in der 32 Schwangerschaftswoche endete. Folglich standen keine Typisierungsdaten dieses totgeborenen Kindes zur Verfügung. Auffällig ist dennoch, dass die Erkrankung in einer folgenden Schwangerschaft auftrat, in der der Fetus Träger des väterlichen HLA-DRB1*02 war, während die darauffolgende Schwangerschaft ohne das paternale HLA-DRB1*02-Allel rezidivfrei blieb.

Bei der Familie 2 kann dieses Phänomen nicht beobachtet werden. Das PG tritt in beiden Schwangerschaften auf, wobei in der ersten Schwangerschaft das Kind nicht Träger des HLA-DRB1*02-Allels ist. Erst in der zweiten, ebenfalls durch PG komplizierten Schwangerschaft kommt es zur Vererbung des väterlichen Haplotypen mit dem HLA-DRB1*02 Allels.

Die Mütter der Familie 2 und 6 besitzen aufgrund ihrer Haplotypen-Konstellationen grundsätzlich ein erhöhtes Risiko für Autoimmunerkrankungen. Sie sind Träger des A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02-Haplotypen, der Teil des sog. 8.1 ancestral haplotype (8.1 AH) ist. Dieser Haplotyp ist einzigartig in Bezug auf seine Assoziation mit einer großen Anzahl an Erkrankungen mit immunpathologischen Befunden (Thorsby 1997; Price, Witt et al. 1999; Caruso, Candore et al. 2000; Candore, Lio et al. 2002).

Der 8.1 AH beeinflusst mehrere Zweige der Immunantwort, wobei das Zytokin-Gleichgewicht verändert wird. Bei Trägern des 8.1 AH ist die Produktion der IL-2, IL-12, IFN- γ (Typ-1 Zytokine) und des IL-5 (Typ-2-Zytokin) eingeschränkt, während die Sekretion des pro-inflammatorischen TNF- α erhöht ist. Das Überwiegen der Typ-2 Zytokinproduktion ist laut Candore et al. neben anderen Faktoren für die erhöhte Inzidenz von Autoimmunerkrankungen unter Trägern des 8.1 AH verantwortlich. (Candore, Lio et al. 2002).

Zusätzlich wiesen molekularbiologische Studien auf besondere Strukturmerkmale der HLA-Klasse I und II Allele des 8.1 AH hin.

Teil des AH 8.1 ist auch das bei PG-Patientinnen gehäuft vorkommende Nullallel des Komplementfaktors C4, der ebenfalls Auswirkungen auf die immunpathologischen Vorgänge hat. Die Mütter der Familie 4 und 5 besitzen jeweils 3 Allele des AH 8.1 Haplotypen. Die Mutter der Familie 4 besitzt A*01, DRB1*03 und DQB1*02, hier fehlt die Assoziation mit

dem C*07-Allel. Bei der Mutter der Familie 5 kommt B*08, C*07, DRB1*03 und DQB1*02 vor, die Assoziation mit A*01 ist nicht vorhanden.

Die Analyse der Haplotypen-Konstellation zeigt, dass das PG bei Patientinnen mit einer genetisch bedingten Prädisposition für Autoimmunerkrankungen auftritt. Bei einer weiteren Gruppe scheint das PG in Zusammenhang mit dem paternalen HLA-DRB1*02 und dem Vorhandensein des HLA-DRB1*04 bei der Mutter aufzutreten.

6. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Assoziation der Autoimmundermatose Pemphigoid gestationis mit Allelen des HLA-Locus. Dazu wurden zum ersten Mal hochauflösende Komplettypisierungen (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, und DPB1) des Patientenkollektivs, der Partner und Kinder der Patientinnen sofern DNA Proben verfügbar waren, durchgeführt. Die Analyse der HLA-Allelfrequenzen ergab, dass die HLA-Allele DRB1*03, B*08 und DQB1*02 DPB1*0101 statistisch signifikant häufiger unter den PG Patientinnen auftraten als bei den Kontrollen. Die Untersuchung der Phänotypfrequenzen zeigte im Vergleich zu dem Kontrollkollektiv ein gehäuftes Auftreten des kombinierten HLA-DRB1*03/*04 Typs im Kollektiv der Mütter und des HLA-DRB1*02 (zusammengesetzt aus DRB1*15 und *16)-Phänotyps bei den Vätern.

Die Typisierungsergebnisse dieser Arbeit decken sich weitgehend mit denen anderer Studien. Aufgrund der Assoziation mit Allelen mehrerer HLA-Loci ist es schwierig zu beurteilen welches Allel einen genetischen Risikofaktor darstellt. Für den Fall einer direkten Beteiligung der HLA-Gene an der Ätiopathogenese der Erkrankung werden grundsätzlich verschiedene Hypothesen, die sich gegenseitig nicht ausschließen, für die funktionelle Rolle der HLA-Moleküle diskutiert (Batchelor JR 1989; Waßmuth 2005, 2. akt. Auflage):

1) Immunmodulation:

Die Fähigkeit, krankheitsrelevante Antigene zu binden und an T-Lymphozyten zu präsentieren, wird durch den Polymorphismus der HLA-Genprodukte bestimmt. Assoziierte bzw. gekoppelte Allele unterscheiden sich in dieser Fähigkeit von nicht-assoziierten bzw. -gekoppelten Allelen und modulieren so die Immunantwort. Die Modulation ist Grundlage der HLA-abhängigen Prädisposition oder Protektion.

2) Immunsuppression:

Die Immunantwort gegen krankheitsrelevante Antigene führt zur Bildung von regulatorischen T-Lymphozyten. Diese können eine antigenspezifische Immunantwort supprimieren. Diese Suppression ist Grundlage der HLA-abhängigen Prädisposition oder Protektion.

3) Klonale Deletion

Durch die Interaktion von Auto-HLA, Antigenen und T-Lymphozytenrezeptor kommt es während der T-Lymphozytenreifung zur Deletion selbstreaktiver T-Lymphozytenklone. Damit einher geht die Deletion des autoreaktiven Anteils des T-Lymphozytenrezeptorrepertoires. Diese „Lücke“ im T-Lymphozytenrezeptorrepertoire kann zu einer ausbleibenden Reaktivität gegenüber bestimmten Antigenen und somit zu einer HLA-abhängigen Prädisposition oder Protektion führen.

4) Molekulare Mimikry:

Das Konzept der molekularen Mimikry geht von dem Vorhandensein einer Epitopgemeinschaft (Mimikry) zwischen HLA-Molekül bzw. an HLA-Molekül gebundenen Peptiden autologer Herkunft und einem Fremdanigen (Alloantigen) aus. Durch diese Epitopgemeinschaft kommt es zu epitopspezifischen Kreuzreaktionen, die eine Modulation der Immunantwort zur Folge haben: Einerseits besteht die Möglichkeit, dass durch die natürliche Toleranz gegenüber dem Autoantigen eine Immunantwort ausbleibt oder supprimiert wird (Kreuztoleranz). Andererseits kann es zu durch die Entwicklung einer alloreaktiven Immunantwort, bedingt durch eine epitopspezifische Kreuzreaktion, zur Autoimmunität kommen.

5) Polygenie - Assoziation mit HLA-Haplotypen:

Der HLA-Komplex ist durch das Vorliegen ausgeprägter Kopplungsungleichgewichte gekennzeichnet. Neben der Möglichkeit, dass einem einzelnen Gen die primäre Assoziation innerhalb einer im Ungleichgewicht liegenden Kopplungsgruppe zukommt, geht die Hypothese der erweiterten Haplotypen (engl. extended haplotype) davon aus, dass die Krankheitsdisposition durch mehrere Gene, deren krankheitsrelevante Allele im Kopplungsungleichgewicht liegen, bedingt ist. Eine kausale Bedeutung für die Krankheitsdisposition wird somit nicht nur für einen Genort des erweiterten Haplotypen angenommen, sondern wird durch einzelne Allele verschiedener Genorte vermittelt. Die Assoziation eines erweiterten Haplotypen ist nicht durch das Kopplungsungleichgewicht, sondern durch primäre Beteiligung der einzelnen Gene bedingt.

Zwischen der Haut und Strukturen der Plazenta besteht eine Antigenverwandtschaft. Das bei dem PG als Autoantigen fungierende BP 180 kommt in der BMZ der Haut als auch in Strukturen der Plazenta vor. Huilaja et al. wiesen BP180 sowohl in den Mikrovilli des Trophoblastensynzytiums, als auch in dem mit mütterlichem Blut gefüllten intervillösen Raum und in invasiven intermediären Trophoblasten nach (Huilaja, Hurskainen et al. 2008). Desweiteren ist BP180 in der humanen Amnionmembran entdeckt worden (Oyama, Bhogal et al. 2003). Abgesehen von dem einschichtigen Epithel (Aplin, Campbell et al. 1985) ähnelt die BMZ der Amnionmembran sehr der der Haut (Champlaud, Lunstrum et al. 1996; Oyama, Bhogal et al. 2003).

Die oben beschriebenen Tatsachen könnten ein Hinweis auf das Phänomen der molekularen Mimikry sein. Die Assoziation mit Allelen mehrerer HLA-Genorte spricht auch für die Assoziation mit HLA-Haplotypen.

Eine indirekte Beteiligung der HLA-Allele wäre im Fall des PG auch denkbar. Shornick et al. berichteten über eine signifikante Häufung des Nullallels des Komplementfaktors C4 in einem PG-Patientinnenkollektiv. 90% der in diese Studie miteinbezogenen PG-Patientinnen wurden als Träger eines C4*QO-Allels identifiziert (Shornick, Artlett et al. 1993). Aufgrund des Kopplungsungleichgewichts zwischen dem DRB1*03 und den C4*QO-Allelen könnte die Assoziation des PG mit DRB1*03 auf einer Kopplung beruhen, mit C4*QO als primärem Genmarker.

Unklar ist weiterhin auch die Rolle des paternalen HLA-DR bei der Pathogenese. In Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur waren etwa die Hälfte (53,85%) der Väter Träger des HLA-DRB1*02-Allels. Die Untersuchung der Genkonstellationen innerhalb der kompletten Familien in Hinblick auf das DRB1*02 lieferte keine aufschlussreichen Informationen. Bei vier der sechs Familien fiel das Auftreten des PG mit der Vererbung eines HLA-DRB1*02 positiven Haplotypen zusammen. Bei zwei weiteren war dies nicht der Fall. Diese Daten sprechen dafür, dass das Vorhandensein von HLA-DRB1*02 in fetalen Zellen weniger die Ursache als ein zusätzlicher Risikofaktor ist.

In der Literatur ist vor allem die Assoziation des PG mit den HLA-Allelen der Klasse II DRB1*03 und *04 beschrieben. Obwohl mit dem Nachweis des Autoantigens BP180 in der Plazenta der primäre Ort der Immunreaktion geklärt werden konnte, ist weiterhin unklar welche Ereignisse zur Induktion dieser Autoimmunreaktion führen.

Interessanterweise exprimiert keine der Trophoblastensubpopulationen, die als Teil der Plazentaschranke in Kontakt mit dem mütterlichen Immunsystem stehen, HLA-Klasse-II-Moleküle.

Die von Borthwick et al 1984 und 1988 beschriebene aberrante Expression von HLA-Molekülen der Klasse II in PG-Plazenten wurde von keiner Arbeitsgruppe neuerer Studien mit moderneren Analysetechniken überprüft. In der 1987 publizierten Studie wurden 6 PG-Plazenten mithilfe monoklonaler Antikörper (mAK) auf ihre HLA-Molekülverteilung untersucht. Die Untersuchungsergebnisse zeigten im Gegensatz zu gesunden Vergleichsplazenten eine aberrante Expression der HLA-Klasse-II-Antigene auf villösen Stromazellen, die an die Dezidua angrenzen und lediglich durch die darüber liegende Zytotrophoblastenschicht getrennt sind. Mit Allotyp-spezifischen mAk wiesen sie die Genprodukte der HLA-Subregionen DR, DP und DQ nach (Borthwick, Sunderland et al. 1984; Borthwick, Holmes et al. 1988).

Borthwick et al. postulierten aufgrund ihrer Forschungsergebnisse, dass es an der fetomaternalen Grenzfläche zum Zellaustausch zwischen Mutter und Fetus käme und so HLA-Klasse-II-Moleküle villöser Mesenchymzellen die PG-spezifische Autoimmunantwort auslösen könnten.

Keine Forschungsergebnisse aktueller Studien bestätigen bislang die Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen auf villösen Stromazellen der Plazenta. Apps et al. (2009) wiesen auf mesenchymalen Zellen von Chorionzotten lediglich die HLA-Klasse-I-Merkmale HLA-A und HLA-B nach (Apps, Murphy et al. 2009).

Jedoch ist ein gewisser gegenseitiger Zellaustausch zwischen Mutter und Fetus trotz der immunologischen Barriere durch die Plazenta möglich (Ariga, Ohto et al. 2001). Der sogenannte fetale Mikrochimärismus wurde als Modell für den Menschen und Tiere mit hämochorialer Plazenta beschrieben (Jimenez, Leapley et al. 2005). Fetale Zellen können über Jahrzehnte post partum in dem mütterlichen Kreislauf persistieren (Bianchi, Zickwolf et al. 1996). Die immunologischen Konsequenzen dieses Phänomens sind seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung. Es gibt Vermutungen, dass der fetale Mikrochimärismus eine potentielle Ursache für Autoimmunerkrankungen bei Frauen ist. Die Leithypothese dazu beinhaltet, dass die semiallogenen fetalen T-Zellen bei den betroffenen Frauen eine Erkrankung vom Graft-versus-Host-Typ auslösen. Diverse Studien berichten über ein gehäuftes Auftreten des fetalen Mikrochimärismus bei Frauen mit systemischer Sklerose (Aractingi, Sabilia et al. 2002; Adams Waldorf and Nelson 2008; Leduc, Aractingi et al.

2009). Desweiteren ist die Assoziation mit der entzündlichen Schwangerschaftsdermatose PEP (polymorphic eruptions of pregnancy) beschrieben (Aractingi, Berkane et al. 1998).

Hingegen sind auch bei einem großen Teil gesunder Frauen ohne jegliche immunologische Funktionsstörung fetale T-Zellen nachweisbar, was die Einschätzung des pathogenetischen Wertes erschwert. Leduc et al. waren die erste Forschungsgruppe, die nachweisen konnte, dass fetale hämatopoetische Progenitorzellen, die während der Schwangerschaft in den mütterlichen Kreislauf übergetreten waren, sich in den primären lymphatischen Organen zu funktionellen T- und B Zellen differenzieren können. Sie stellte die Vermutung auf, dass derartige fetale T-Zellen in dem Thymus der Mutter einem Reifungsprozess, im Sinne einer positiven und negativen Selektion unterzogen werden und so einer allogenen Reaktion vorgebeugt werden kann. Ein gewisses Maß an Gewebeverträglichkeit soll hierbei für die positive Selektion notwendig sein. Auf diese Art und Weise erklären Leduc et al. das Auftreten von Mikrochimärismen bei gesunden Frauen (Leduc, Aractingi et al. 2009).

Umgekehrt könnte das gehäufte Auftreten von Mikrochimärismen bei Patientinnen mit Autoimmunerkrankungen als mangelnde Histokompatibilität fetaler T-Zellen, die in dem mütterlichen Thymus nicht aussortiert wurden und folglich eine alloreaktive Reaktion vermitteln, interpretiert werden.

Für die Autoimmundermatose PG wäre der fetale Mikrochimärismus eine mögliche Quelle der HLA-Klasse II exprimierenden Zellen und so ein potentieller Ansatz für die Erklärung der Initiierung der Autoimmunreaktion dieser sehr seltenen Erkrankung. Dagegen spricht, dass das PG häufig bereits in der ersten Schwangerschaft auftritt, die übergetretenen fetalen hämatopoetischen Progenitorzellen sich zunächst in den primären lymphatischen Organen der Mutter differenzieren und reifen müssen, bevor sie in dem peripheren Blutstrom nachweisbar sind.

Das fetale HLA-C auf extravillösen Trophoblasten ist das einzige hochpolymorphe HLA, das in Kontakt mit immunkompetenten Zellen der Mutter steht. Die Decidua des Uterus enthält eine große Anzahl an NK-Zellen, die direkt und/oder über ihr Zytokinexpressionsmuster die Implantation, den mütterlichen Blutstrom in die Plazenta und das Immunmilieu kontrollieren. Diese Zellen tragen im Vergleich zu NK-Zellen aus dem Blut vermehrt HLA-C-reaktive KIR auf der Zelloberfläche. Daher wird angenommen, dass KIR-HLA-C-Interaktionen besonders wichtig für eine normale Plazentaphysiologie sind. (Sharkey, Gardner et al. 2008; Poli, Michel et al. 2009)

Aus diesem Grund wurde die mögliche funktionelle Rolle von HLA-C bei der Pathogenese der Erkrankung überprüft. Dazu wurde das Verteilungsmuster der HLA-C-Allele kompletter Familien in Bezug auf ihre C1- und C2-Spezifität untersucht. Jedoch waren keine gemeinsamen Vererbungsmuster ersichtlich, was die funktionelle Rolle des HLA-C bei dieser Erkrankung sehr unwahrscheinlich macht. Dies gilt auch für die Vererbung und das Auftreten der HLA-B-Determinanten Bw4 und Bw6.

Als weiterer Ansatzpunkt zur Analyse der Assoziation des PG mit HLA-Allelen wurden die Aminosäuresequenzen der in dem PG-Patientinnenkollektiv vorkommenden Allele auf Gemeinsamkeiten untersucht.

Grundsätzlich weisen die bei PG Patientinnen gehäuft auftretenden HLA-DRB1*03- und *04-Allele Strukturähnlichkeiten in Bezug auf die Aminosäuresequenz auf. Abgesehen davon besaßen fast alle in dem PG-Patientinnen-Kollektiv auftretenden Allele in Position 9 die AS Glutamat (E), in Position 28 die AS Aspartat (D), in Position 30 die AS Tyrosin (Y), in Position 31 die AS Phenylalanin (F) und zahlreiche Allele in Position 86 die AS Valin (V).

16 der 18 Patientinnen wurden als homozygote Träger in Bezug auf mindestens 3 dieser Positionen bestimmt, 2 als heterozygote Träger.

Für diverse Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1, Rheumatoide Arthritis, Morbus Basedow oder Hashimoto Thyreoditis lieferten verschiedene Studien Hinweise, dass die Erkrankungen mit spezifischen AS-Sequenzen der HLA-Klasse-II-Moleküle assoziiert sind. (Todd, Bell et al. 1987; Nelson and Hansen 1990; Winchester 1994; Ban, Davies et al. 2004; Menconi, Monti et al. 2008) Diese Forschungsgruppen vermuteten einen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Varianten der Bindungsgruben der HLA-Moleküle und der unterschiedlich hohen Affinität der Allele zu Autoantigenen. Im Fall des Diabetes mellitus Typ I zeigten verschiedene Studien einen Zusammenhang zwischen den HLA-Allelen DQB1*08 und DQB1*02 und der Anfälligkeit für die Erkrankung. Untersuchungen auf molekularer Ebene gaben darüber Aufschluss, dass HLA-DQB1-Allele mit einem β 57-Polymorphismus, bei dem die saure AS Aspartat durch eine ungeladene AS ersetzt ist, ein höheres Erkrankungsrisiko bergen. Die Bindungsgruben der Allele DQB1*08, *02 verfügen über Strukturmerkmale, die die Präsentation des für die Erkrankung entscheidenden Insulin-B-Peptids ermöglichen. (Lee, Wucherpfennig et al. 2001; Wucherpfennig 2001; Wucherpfennig 2003)

Im Fall des PG-Patientinnen-Kollektivs könnten die Ergebnisse der Untersuchung der Aminosäuresequenzen ein Hinweis auf die Assoziation mit bestimmten Aminosäuren an polymorphen Positionen sein. Es muss aber auch bedacht werden, dass HLA-DRB1-Allele ohne dieses Motiv mit einer Allelfrequenz von <30% angegeben sind.

Abschließend ist zu sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit eine Assoziation mit Allelen verschiedener HLA-Loci aufzeigen bzw. bestätigen, aber die Frage, welche immunologischen Ereignisse der Initiierung der Erkrankung zu Grunde liegen, unbeantwortet bleibt.

7. Zusammenfassung

Die bullöse Dermatose Pemphigoid gestationis ist eine äußerst seltene schwangerschaftsassozierte Autoimmunerkrankung, bei der Antikörper gegen Strukturen der Plazenta produziert werden, die mit dem BP180 der mütterlichen Haut kreuzreagieren und schließlich zur Blasenbildung führen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Assoziation der Erkrankung mit sämtlichen klassischen Humanen Leukozyten-Antigenen (HLA) zu überprüfen. Dafür wurden HLA-Komplettypisierungen (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1) bei 18 betroffenen Patientinnen und falls vorhanden von Partnern und Kindern der Betroffenen vorgenommen. Von Kindern und Partnern standen insgesamt 27 DNA-Proben zur Verfügung.

Diverse Studien wiesen eine Assoziation der Erkrankung mit den HLA-Klasse II-Allelen HLA-DRB1*03 und *04 nach. Eine pathogenetische Rolle paternaler HLA-Moleküle bei der Erkrankung wird aufgrund der Häufung des HLA-DRB1*02-Phänotyps im Kollektiv der Partner vermutet.

Die statistischen Berechnungen der Typisierungsergebnisse dieser Arbeit zeigten im Kollektiv der PG-Patientinnen eine signifikante Häufung der HLA-Allele B*08 ($p=0,0019$), B*18 ($p=0,0455$), DRB1*03 ($p=0,001$), DQB1*02 ($p=0,0283$) und DPB1*0101 ($p=0,0011$). In Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur trat im PG-Patientinnen-Kollektiv der DRB1*03/*04-Phänotyp und im Kollektiv der Partner der HLA-DR02-Phänotyp signifikant gehäuft auf.

Untersuchungen auf Aminosäureebene zeigten Gemeinsamkeiten der HLA-DRB1-Allele, die in dem Kollektiv der Mütter vertreten waren auf. Bei der Betrachtung der Genkonstellationen kompletter Stammbäume war ersichtlich, dass im Fall von 3 der 6 aufgeführten Stammbäume die Vererbung des väterlichen DRB1*02-Alleles mit der Krankheitsentwicklung in der entsprechenden Schwangerschaft zusammenfiel.

Es wurden keine Hinweise gefunden, dass die Interaktion von HLA-C bzw. HLA-B mit KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors) für das Auftreten der Krankheit eine Rolle spielen. Die Ergebnisse legen einerseits nahe, dass aufgrund der Häufung von Allelen verschiedener HLA-Loci mehrere Gene eine ätiopathogenetische Rolle spielen, andererseits die Häufung mehrerer Gene verschiedener Loci auf einer Kopplung beruhen könnte. Desweiteren liefern die Untersuchungen der Aminosäuresequenzen Hinweise darauf, dass sich bestimmte Aminosäuresubstitutionen in der Bindungsgrube der HLA-Klasse II-Moleküle als protektiv

oder als erhöhtes Risiko auswirken könnten. Die Rolle des väterlichen HLA-DR bleibt weiterhin ungeklärt. Die Konstellation der HLA-DR-Vererbung innerhalb kompletter Familien suggeriert, dass die Vererbung des HLA-DRB1*02 an das Kind als zusätzlicher Risikofaktor zu bewerten ist, aber nicht als ursächlich für die Erkrankung betrachtet werden kann. Zur weiteren Klärung der paternalen Rolle wäre die Überprüfung der HLA-Klasse II-Expression in PG-Plazenten mit modernen molekularbiologischen Methoden von großem Interesse.

8. Anhang

8.1 Typisierungsdaten

Nr.	Fam. Nr.	Verw. Grad	A*-1	A*-2	B*-1	B*-2	C*-1	C*-2	DRB1*-1	DRB1*-2	DQB1*-1	DQB1*-2	DPB1*-1	DPB1*-2
195163	1	Mutter	0101	1101	1517	1801	0701		0403	1302	0302	0604	0401	0501
195164	1	Vater	0301	3101	0702	3502	0401	0702	0301	1601	0201	0502	0402	5101
195165	1	Tochter, 1	1101	3101	1801	3502	0401	0701	0301	0403	0201	0302	0401	5101
195166	1	Sohn, 2	0301	1101	0702	1801	0701	0702	0403	1601	0302	0502	0401	0402
195167	1	Sohn, 3	0101	0301	0702	1517	0701	0702	1302	1601	0502	0604	0402	0501
195703	1	Tochter, 4	0101	0301	0702	1517	0701	0702	1302	1601	0502	0604	0402	0501
195704	1	Sohn, 5	1101	3101	1801	3502	0401	0701	0301	0403	0201	0302	0401	5101
195705	1	Tochter, 6	0301	1101	0702	1801	0701	0702	0403	1601	0302	0502	0401	0402
195185	2	Mutter	0101	0201	0801		0701		0301		0201		0201	0301
195186	2	Vater	1101	2501	1801	5501	0303	1203	1454	1501	0503	0602	1001	2301
195188	2	Sohn, 1	0201	1101	0801	5501	0303	0701	0301	1454	0201	0503	0201	1001
195187	2	Sohn, 2	0101	2501	0801	1801	0701	1203	0301	1501	0201	0602	0301	2301
195175	3	Mutter	0201	0301	3501	4402	0401	0501	0401	1454	0302	0503	0401	0901
195176	3	Vater	0201	0301	0702	1501	0304	0702	0401	1501	0302	0602	0401	
195688	3	Tochter, 1	0301		0702	3501	0401	0702	0401	1501	0302	0602	0401	
195689	3	Sohn, 2	0201	0301	1501	3501	0304	0401	0401		0302		0401	

Nr.	Fam. Nr.	Verw. Grad	A*-1	A*-2	B*-1	B*-2	C*-1	C*-2	DRB1*-1	DRB1*-2	DQB1*-1	DQB1*-2	DPB1*-1	DPB1*-2
195179	4	Mutter	0101	3101	4001	5101	0304	1402	0301	0404	0201	0302	0401	0402
195180	4	Vater	0201		0702	4403	0401	0702	0701	1501	0202	0602	0401	1401
195181	4	Sohn, 1	0201	3101	0702	4001	0304	0702	0404	1501	0302	0602	0401	0402
195183	4	Tochter, 2	0101	0201	4403	5101	0401	1402	0301	0701	0201	0202	0402	1401
195723	4	Tochter, 3	0101	0201	4403	5101	0401	1402	0301	0701	0201	0202	0402	1401
195195	5	Mutter	3201	6801	0801	3801	0701	1203	0101	0301	0201	0501	0101	0401
195196	5	Vater	0101	0302	3503	5101	0401	1502	1101		0301		0401	0402
195197	5	Sohn, 1	0302	3201	3801	5101	1203	1502	0101	1101	0301	0501	0401	0402
195880	6	Mutter	0101	2501	0801		0701		0301		0201		0101	
195879	6	Vater	0201	2501	1501	4402	0401	0501	1501	1601	0502	0602	1001	1701
195199	6	Tochter	0201	2501	1501	0801	0401	0701	1501	0301	0602	0201	1701	0101
195162		Mutter	0201	2301	4901	5101	0401	0701	0301	0401	0201	0301	0301	0401
195724		Vater	0301	2402	4001	4501	0304	0602	0401	0801	0301	0402	0201	0301
195640		Mutter	0101	2902	1501	5801	0303	0701	14	08	0402	0503	0201	
195168		Mutter	0201	1101	0801	3801	0701	1203	0301	0402	0201	0302	0101	0401
195169		Vater	0201	2402	1801	5101	0102	0701	0801	1501	0402	0502	0401	
195170		Mutter	1101	2601	4901	5501	0303	0701	0301	1302	0201	0604	0201	
195171		Vater	0201	6801	1302	1801	0602	0701	0701	1301	0202	0603	0201	1701

Nr.	Fam. Nr.	Verw. Grad	A*-1	A*-2	B*-1	B*-2	C*-1	C*-2	DRB1*-1	DRB1*-2	DQB1*-1	DQB1*-2	DPB1*-1	DPB1*-2
195172		Mutter	3004	7403	0702	0801	0602	0702	0301	1302	0201	0604	0401	
195173		Vater	0101	2301	2705	4403	0102	0401	0101	0701	0202	0501	0201	0402
195174		Mutter	3201	3301	0801	1402	0701	0802	0102	0301	0201	0501	0101	
195177		Mutter	0201	0301	1801	1805	0701	1203	1104	1601	0301	0502	0101	0402
195184		Mutter	0201	2601	4405	5601	0102	0202	1301	1601	0502	0603	0201	1001
195189		Mutter	3201	6801	1801	5108	0701	1602	1302	1501	0602	0604	0201	0401
195190		Vater	0101	0301	3701	4402	0501	0602	0401	1103	0301		0402	
195191		Mutter	0101	0301	3701	4402	0501	0602	0401	1103	0301		0402	
195193		Mutter	0101	1101	0801	5101	0701	1502	0301	0404	0201	0302	0301	0401
195194		Vater	0201	0301	0702	1501	0303	0702	1302	1501	0602	0604	0301	0401
195198		Mutter	0101	2601	0801	3701	0602	0701	1101	1501	0301	0602	0401	0402
195199		Vater	1101	2902	3503	4403	0401	1601	0404	0701	0202	0302	0101	1401

8.2 Aminosäuresequenzen der typisierten HLA-Klasse-I und HLA-Klasse-II-Loci der Pemphigoid gestationis Patientinnen

Aminosäuresequenzen der DRB1-Allele des PG-Patientinnenkollektivs

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
DRB1*010101	GDTRPRFLWQ	LKFECHFFNG	TERVRLLERC	IYNQEEVRF	DSDVGEYRAV	TELGRPDAEY	WNSQKDLLEQ	RRAAVDTYCR	HNYGVGESFT	VQRRVEPKVT
DRB1*010201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----AV-----	-----	-----
DRB1*03010101	-----EY	STS-----	-----Y-D-Y	FH----N---	-----F---	-----	-----	K-GR--N---	-----V----	-----H----
DRB1*040101	-----E-	V-H-----	-----F-D-Y	F-H---Y---	-----	-----	-----	K-----	-----	-----Y-E--
DRB1*0402	-----E-	V-H-----	-----F-D-Y	F-H---Y---	-----	-----	-----I--D	E-----	-----V----	-----Y-E--
DRB1*040301	-----E-	V-H-----	-----F-D-Y	F-H---Y---	-----	-----	-----	---E-----	-----V----	-----Y-E--
DRB1*0404	-----E-	V-H-----	-----F-D-Y	F-H---Y---	-----	-----	-----	-----	-----V----	-----Y-E--
DRB1*110101	-----EY	STS-----	-----F-D-Y	F-----Y---	-----F---	-----E--	-----F--D	-----	-----	-----H----
DRB1*1103	-----EY	STS-----	-----F-D-Y	F-----Y---	-----F---	-----E--	-----F--D	E-----	-----V----	-----H----
DRB1*110401	-----EY	STS-----	-----F-D-Y	F-----Y---	-----F---	-----E--	-----F--D	-----	-----V----	-----H----
DRB1*130101	-----EY	STS-----	-----F-D-Y	FH----N---	-----F---	-----	-----I--D	E-----	-----V----	-----H----
DRB1*130201	-----EY	STS-----	-----F-D-Y	FH----N---	-----F---	-----	-----I--D	E-----	-----	-----H----
DRB1*1454	-----EY	STS-----	-----F-D-Y	FH----F---	-----	-----A--H	-----R	---E-----	-----V----	-----H----
DRB1*15010101	-----	P-R-----	-----F-D-Y	F-----	-----F---	-----	-----I---	A-----	-----V----	-----Q----
DRB1*160101	-----	P-R-----	-----F-D-Y	F-----	-----	-----	-----F--D	-----	-----	-----Q----

Aminosäuresequenzen der DQB1-Allele des PG-Patientinnenkollektivs

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
DQB1*050101	RDSPEDFVYQ	FKGLCYFTNG	TERVRGVTRH	IYNREEYVRF	DSDVGVYRAV	TPQGRPVAEY	WNSQKEVLEG	ARASVDRVCR	HNYEVAYRGI	LQRRVEPTVT
DQB1*030201	-----	---M-----	-----L---Y	-----A--	-----	--L-P-A---	-----R	T--EL-T---	---QLEL-TT	-----
DQB1*030101	-----	--AM-----	-----Y---Y	-----A--	---E-----	--L-P-D---	-----R	T--EL-T---	---QLEL-TT	-----
DQB1*050201	-----	-----	-----	-----	-----	-----S---	-----	-----	-----	-----
DQB1*050301	-----	-----	-----	-----	-----	-----D---	-----	-----	-----	-----
DQB1*020101	-----	---M-----	-----L-S-S	-----I---	-----EF---	--L-L-A---	-----DI--R	K--A-----	---QLEL-TT	-----
DQB1*040101	-----F-	---M-----	--L-----Y	-----A--	-----	--L--LD---	-----DI--E	D-----T---	---QLEL-TT	-----
DQB1*0402	-----F-	---M-----	-----Y	-----A--	-----	--L--LD---	-----DI--E	D-----T---	---QLEL-TT	-----
DQB1*060101	--P-----L-	--AM-----	-----Y---Y	-----D---	-----	-----D---	-----DI--R	T--EL-T---	-----F---	-----
DQB1*060201	-----F-	---M-----	-----L---Y	-----A--	-----	-----D---	-----	T--EL-T---	-----F---	-----
DQB1*060301	-----	---M-----	-----L---	-----A--	-----	-----D---	-----	T--EL-T---	-----F---	-----
DQB1*060401	-----	---M-----	-----L---	-----A--	-----	-----	-----R	T--EL-T---	-----G---	-----

Aminosäuresequenzen der DPB1*-Allele des PG-Patientinnenkollektivs

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
DPB1*010101	RATPENYVYQ	GRQECYAFNG	TQRFLERYIY	NREEYARFDS	DVGEFRAVTE	LGRPAAEYWN	SQKDILEEKR	AVPDRVCRHN	YELDEAVTLQ	RRVQPKVNVS
DPB1*020102	-----LF-	-----	-----	---FV---	-----	---DE---	-----E-	-----M---	---GGPM---	-----R---
DPB1*030101	-----	L-----	-----	---FV---	-----	---DED---	---L---	-----	-----	-----
DPB1*040101	-----LF-	-----	-----	---F---	-----	-----	-----	-----M---	---GGPM---	-----R---
DPB1*0402	-----LF-	-----	-----	---FV---	-----	---DE---	-----	-----M---	---GGPM---	-----R---
DPB1*050101	-----LF-	-----	-----	---LV---	-----	---E---	-----	-----M---	-----	-----
DPB1*0901	-----H-	L-----	-----	---FV---	-----	---DED---	-----E-	-----	-----	-----
DPB1*1001	*****--H-	L-----	-----	---FV---	-----	---DE---	-----E-	-----	-----	*****

Aminosäuresequenzen der A*-Allele des PG-Patientinnenkollektivs

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
A*01010101	GSHSMRYFFT	SVSRPGRGEP	RFIAVGYVDD	TQFVRFSDA	ASQKMEPRAP	WIEQEGPEYW	DQETRNMKAH	SQTDRANLGT	LRGYYNQSED	GSHTIQIMYG
A*02010101	-----	-----	-----	-----	---R-----	-----	-G---KV---	---H-VD---	-----A	---V-R---
A*03010101	-----	-----	-----	-----	---R-----	-----	-----V--Q	-----VD---	-----A	-----
A*11010101	-----Y-	-----	-----	-----	---R-----	-----	-----V--Q	-----VD---	-----	-----
A*23010101	-----S-	-----	-----	-----	---R-----	-----	-E--GKV---	-----E--RI	ALR-----	---L-M-F-
A*25010101	-----Y-	-----	-----	-----	---R-----	-----	-RN---V---	-----ES-RI	ALR-----	-----R---
A*26010101	-----Y-	-----	-----	-----	---R-----	-----	-RN---V---	-----	-----	-----R---
A*29020101	-----T-	-----	-----	-----	---R-----	-----	-LQ---V--Q	-----	-----A	-----M---
A*3004	*-----S-	-----S-	-----	-----	---R-----	-----R---	-----V---	-----E---	-----A	-----
A*31010201	-----T-	-----	-----	-----	---R-----	-----R---	-----V---	--I--VD---	-----A	-----M---
A*32010101	-----	-----	-----	-----	---R-----	-----	-----V---	-----ES-RI	ALR-----	-----M---
A*33010101	-----T-	-----	-----	-----	---R-----	-----	-RN---V---	--I--VD---	-----A	-----M---
A*68010101	-----Y-	-----	-----	-----	---R-----	-----	-RN---V--Q	-----VD---	-----A	-----M---
A*7403	*-----	-----	-----	-----	---R-----	-----	-----V---	-----VD-A-	-----A	-----M---

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
A*01010101	CDVGPDGRFL	RGYRQDAYDG	KDYIALNEDL	RSWTAADMAA	QITKRKWEAV	HAAEQRRVYL	EGRCVDGLRR	YLENGKETLQ	RTDPPKTHMT	HHPISDHEAT
A*02010101	----S-W---	---H-Y----	-----K---	-----	-T--H----A	-V---L-A--	--T--EW---	-----	---A-----	--AV-----
A*03010101	----S-----	-----	-----	-----	-----A	-E---L-A--	D-T--EW---	-----	-----	-----
A*110101	-----	-----	-----	-----	-----A	----Q-A--	-----EW---	-----	-----	-----
A*230101	---S-----	---H-Y----	-----K---	-----	---Q-----A	RV---L-A--	--T-----	-----	-----	-----
A*250101	-----	---Q-----	-----	-----	---Q---TA	-E---W-A--	-----EW---	-----	---A-----	--AV-----
A*260101	-----	---Q-----	-----	-----	---Q---TA	-E---W-A--	-----EW---	-----	---A-----	--AV-----
A*290201	---S-----	-----	-----	-----	---Q-----A	RV---L-A--	--T--EW---	-----	---A-----	--AV-----
A*3004	---S-----	---E-H----	-----	-----	---Q-----A	-V---W-A--	--T--EW---	-----	-----	-----
A*310102	---S-----	---Q-----	-----	-----	---Q-----A	RV---L-A--	--T--EW---	-----	-----	--AV-----
A*320101	-----L-	---Q-----	-----	-----	---Q-----A	RV---L-A--	--T--EW---	-----	---A-----	--AV-----
A*330101	---S-----	---Q-----	-----	-----	---Q-----A	RV---L-A--	--T--EW---	H-----	-----R---	--AV-----
A*680101	---S-----	-----	-----K---	-----	-T--H----A	-V---W-A--	--T--EW---	-----	---A-----	--AV-----
A*7403	-----L-	---Q-----	-----	-----	---Q-----A	RV---L-A--	--T--EW---	-----	---A-----	--AV-----

Aminosäuresequenzen der B*-Allele des PG-Patientinnenkollektivs

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
B*070201	GSHSMRYFYT	SVSRPGRGEP	RFISVGYVDD	TQFVRFDSDA	ASPREEPRAP	WIEQEGPEYW	DRNTQIYKAQ	AQTDRESLRN	LRGYNQSEA	GSHTLQSMYG
B*080101	-----D-	AM-----	-----	-----	-----	-----	-----F-TN	T-----	-----	-----
B*15010101	-----	AM-----	---A-----	-----	---MA-----	-----	--E---S-TN	T--Y-----	-----	-----R---
B*140201	-----	A-----	-----	-----	-----	-----	-----C-TN	T-----	-----	-----W---
B*15170101	-----	AM-----	---A-----	-----	---MA-----	-----	--E-RNM--S	---Y--N--I	ALR-----	-----R---
B*180101	-----H-	-----	-----G	-----	---T-----	-----	-----S-TN	T--Y-----	-----	-----R---
B*1805	*-----H-	-----	-----G	-----	---T-----	-----	-----S-TN	T--Y-----	-----	-----R---

B*350101 ----- AM----- ---A----- -----T----- -----F-TN T--Y----- -----II-R--
 B*370101 -----H- -----S-TN T--Y--D--T -LR----- ---I-R-S-
 B*380101 -----C-TN T--Y--N--I ALR----- ---R--
 B*400101 -----H- AM----- ---T----- -L----- T---K----- ---E---S-TN T--Y----- ---R--
 B*44020101 ----- AM----- ---T----- -L----- T---K----- ---E---S-TN T--Y--N--T ALR----- ---II-R--
 B*4405 ----- AM----- ---T----- -L----- T---K----- ---E---S-TN T--Y--N--T ALR----- ---II-R--
 B*490101 -----H- AM----- ---T----- -L----- T---K----- ---E---S-TN T--Y--N--I ALR----- ---W-R--
 B*510101 ----- AM----- ---A----- -----T----- -----F-TN T--Y--N--I ALR----- ---W-T--
 B*5108 ----- AM----- ---A----- -----T----- -----F-TN T--Y--N--I ALR----- ---W-T--
 B*550101 ----- AM----- ---A----- -----T----- -----F-TN T--Y--N--I ALR----- ---W-T--
 B*580101 ----- AM----- ---A----- -----T----- -----GE-RNM--S ---Y--N--I ALR----- ---II-R--

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
B*070201	CDVGP	DGRLL	RGHDQYAYDG	KDYIALNEDL	RSWTAADTAA	QITQRKWEAA	REAEQRRAYL	EGECVEWLRR	YLENGKDKLE	RADPPKTHVT	HHPISDHEAT
B*080101	-----	---N-----	-----	-----	-----	---V---D---	---T-----	-----T--	-----	-----	
B*15010101	-----	---S-----	-----	S-----	-----	---W---	---L-----	-----ET-Q	-----	-----	
B*140201	-----	---YN-F---	-----	S-----	-----	---L---	---T-----	H---ET-Q	-----	-----	
B*15170101	-----	---YH-D---	-----	S-----	-----	---L---	---L-----	-----ET-Q	-----	-----	
B*180101	-----	---S-----	-----	S-----	-----	---V---L---	---T-----	H---ET-Q	-----	-----	
B*1805	-----	---S-----	-----K---	S-----	-----	---V---L---	---T-----	H---ET-Q	*****	*****	
B*350101	---L-----	---S-----	-----	S-----	-----	---V---L---	---L-----	-----ET-Q	-----	---V-----	
B*370101	-----	---YN-F---	-----	S-----	-----	---V---D---	---T-----	-----ET-Q	-----	-----	
B*380101	-----	---N-F---	-----	S-----	-----	---V---L-T--	---T-----	-----ET-Q	-----	-----	
B*400101	-----	---N-----	-----	-----	---S---L---	---V---L---	-----	-----	-----	-----	
B*44020101	-----	---Y--D---	-----	S-----	-----	---V---D---	---L---S---	-----ET-Q	-----	-----V-	
B*4405	-----	---Y-----	-----	S-----	-----	---V---D---	---L---S---	-----ET-Q	-----	-----V-	

```

B*490101    --L----- --YN-L---- ----- S----- -----L----- --L----- -----ET-Q -----
B*510101    ----- --N----- ----- S----- -----L----- --L----- H-----ET-Q -----V-----
B*580101    --L----- -----S----- S----- -----V---L----- --L----- -----ET-Q -----V-----

```

Aminosäuresequenzen der C*-Allele des PG-Patientinnenkollektivs

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Cw*010201	CSHSMKYFFT	SVSRPGRGEP	RFISVGYVDD	TQFVRFSDA	ASPRGEPRAP	WVEQEGPEYW	DRETQKYKRO	AQTDRVSLRN	LRGYNQSEA	GSHTLQWMCG
Cw*020201	----R--Y-	A---S----	H--A-----	-----	-----	-----	-----	-----N--K	-----	-----R-Y-
Cw*030301	G---R--Y-	A-----	H--A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	R--II-R-Y-
Cw*030401	G---R--Y-	A-----	H--A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---II-R-Y-
Cw*04010101	G---R--S-	---W-----	---A-----	-----	-----E-	-----	-----	--A---N--K	-----D	-----R-F-
Cw*05010101	----R--Y-	A-----	---A-----	---Q----	-----	-----	-----	-----N--K	-----	-----R-Y-
Cw*06020101	----R--D-	A-----	-----	-----	-----	-----	-----	--A---N--K	-----D	-----Y-
Cw*070101	----R--D-	A-----	-----	-----	-----	-----	-----N----	--A-----	-----D	-----R-Y-
Cw*07020101	----R--D-	A-----	-----	-----	-----	-----	-----	--A-----	-----D	-----R-S-
Cw*0802	----R--Y-	A-----	---A-----	---Q----	-----	-----	-----	-----	-----	-----R-Y-
Cw*12030101	----R--Y-	A-----	---A-----	-----	-----	-----	-----	--A-----	-----	-----Y-
Cw*140201	----R--S-	-----	---A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----F-
Cw*150201	----R--Y-	A-----	H--A-----	-----	-----	-----	-----N----	-----N--K	-----	---II-R-Y-
Cw*1602	----R--Y-	A-----	---A-----	-----	-----	-----	-----	-----N--K	-----	-----Y-

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Cw*010201	CDLGPDGRLL	RGYDQYAYDG	KDYIALNEDL	RSWTAADTAA	QITQRKWEAA	REAEQRRAYL	EGTCVEWLRR	YLENGKETLQ	RAEHPKTHVT	HPVSDHEAT
Cw*020201	-----	----S----	-----	-----	-----	----W----	--E-----	-----	-----	-----
Cw*030301	--V-----	-----	-----	-----	-----	----L----	--L-----	--K-----	-----	-----
Cw*030401	--V-----	-----	-----	-----	-----	----L----	--L-----	--K-----	-----	-----
Cw*04010101	-----	---N-F---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cw*05010101	-----	---N-F---	-----	-----K--	-----	-----	-----	-----K--	-----	-----
Cw*06020101	-----	----S----	-----	-----	-----	----W----	-----	-----	-----	-----
Cw*070101	-----	----S----	-----	-----	-----L--	-A--L---	-----	-----	---P----	---L----
Cw*07020101	-----	----S----	-----	-----	-----L--	-A--L---	-----	-----	---P----	---L----
Cw*0802	-----	---N-F---	-----	-----K--	-----	-----	-----	-----K--	-----	-----
Cw*12030101	-----	----S----	-----	-----	-----	----W----	-----	-----	-----	-----
Cw*140201	-----	----S----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cw*150201	-----	--H--L---	-----	-----	-----	----L----	-----	-----	-----	-----
Cw*1602	-----	----S----	-----	-----	-----	-A--Q---	-----	-----	-----	--L----

8.3 Referenzen

- (2004). "Fallberichte." Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft **2**(10): 848-857.
- Adams Waldorf, K. M. and J. L. Nelson (2008). "Autoimmune disease during pregnancy and the microchimerism legacy of pregnancy." Immunol Invest **37**(5): 631-44.
- Al-Fouzan, A. W., I. Galadari, et al. (2006). "Herpes gestationis (Pemphigoid gestationis)." Clin Dermatol **24**(2): 109-12.
- Amato, L., G. Coronella, et al. (2002). "Successful treatment with doxycycline and nicotinamide of two cases of persistent pemphigoid gestationis." J Dermatolog Treat **13**(3): 143-6.
- Amato, L., S. Mei, et al. (2003). "A case of chronic herpes gestationis: persistent disease or conversion to bullous pemphigoid?" J Am Acad Dermatol **49**(2): 302-7.
- Ambros-Rudolph, C. M. (2008). "Dermatosen in der Schwangerschaft." CME Dermatologie: 52-64.
- Ambros-Rudolph, C. M., R. R. Müllegger, et al. (2006). "The specific dermatoses of pregnancy revisited and reclassified: Results of a retrospective two-center study on 505 pregnant patients." Journal of the American Academy of Dermatology **54**(3): 395-404.
- Aoyama, Y., K. Asai, et al. (2007). "Herpes gestationis in a mother and newborn: immunoclinical perspectives based on a weekly follow-up of the enzyme-linked immunosorbent assay index of a bullous pemphigoid antigen noncollagenous domain." Arch Dermatol **143**(9): 1168-72.
- Aplin, J. D., S. Campbell, et al. (1985). "The extracellular matrix of human amniotic epithelium: ultrastructure, composition and deposition." J Cell Sci **79**: 119-36.
- Apps, R., L. Gardner, et al. (2008). "Conformation of human leucocyte antigen-C molecules at the surface of human trophoblast cells." Immunology **124**(3): 322-8.
- Apps, R., L. Gardner, et al. (2007). "A homodimeric complex of HLA-G on normal trophoblast cells modulates antigen-presenting cells via LILRB1." Eur J Immunol **37**(7): 1924-37.
- Apps, R., L. Gardner, et al. (2008). "Natural-killer cell ligands at the maternal-fetal interface: UL-16 binding proteins, MHC class-I chain related molecules, HLA-F and CD48." Human Reproduction **23**(11): 2535-2548.

- Apps, R., S. P. Murphy, et al. (2009). "Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies." Immunology **127**(1): 26-39.
- Aractingi, S., N. Berkane, et al. (1998). "Fetal DNA in skin of polymorphic eruptions of pregnancy." Lancet **352**(9144): 1898-901.
- Aractingi, S., J. Sibilias, et al. (2002). "Presence of microchimerism in labial salivary glands in systemic sclerosis but not in Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum **46**(4): 1039-43.
- Ariga, H., H. Ohto, et al. (2001). "Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis." Transfusion **41**(12): 1524-30.
- Ban, Y., T. F. Davies, et al. (2004). "Arginine at position 74 of the HLA-DR beta1 chain is associated with Graves' disease." Genes Immun **5**(3): 203-8.
- Batchelor JR, F. H., Walport MJ (1989). "Immunobiologie of HLA." HLA class II complement genes and susceptibility to systemic lupus erythematosus (SLE) **Dupont B (ed)**: 447.
- Bianchi, D. W., G. K. Zickwolf, et al. (1996). "Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(2): 705-8.
- Blaschitz, A., H. Hutter, et al. (2001). "HLA Class I protein expression in the human placenta." Early Pregnancy **5**(1): 67-9.
- Borrego, F., M. Ulbrecht, et al. (1998). "Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis." J Exp Med **187**(5): 813-8.
- Borthwick, G. M., R. C. Holmes, et al. (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**(1): 81-94.
- Borthwick, G. M., C. A. Sunderland, et al. (1984). "Abnormal expression of HLA-DR antigen in the placenta of a patient with pemphigoid gestationis." J Reprod Immunol **6**(6): 393-6.
- Boulinguez, S., C. Bedane, et al. (2003). "Chronic pemphigoid gestationis: comparative clinical and immunopathological study of 10 patients." Dermatology **206**(2): 113-9.

- Budinger, L., L. Borradori, et al. (1998). "Identification and characterization of autoreactive T cell responses to bullous pemphigoid antigen 2 in patients and healthy controls." J Clin Invest **102**(12): 2082-9.
- C. Sitaru, J. P. I. S. S. J. G. K. F. W. D. Z. (2003). "Pemphigoid gestationis: maternal sera recognize epitopes restricted to the N-terminal portion of the extracellular domain of BP180 not present on its shed ectodomain." British Journal of Dermatology **149**(2): 420-422.
- Candore, G., D. Lio, et al. (2002). "Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: effect of multiple gene interactions." Autoimmun Rev **1**(1-2): 29-35.
- Carosella, E., M. Kirszenbaum, et al. (1995). "[HLA-G: a non classical antigen of major histocompatibility complex]." C R Acad Sci III **318**(8): 827-30.
- Caruso, C., G. Candore, et al. (2000). "HLA, aging, and longevity: a critical reappraisal." Human Immunology **61**(9): 942-949.
- Cassian, S., G. Matthias, et al. (2004). "Bullöse Autoimmundermatosen (I): Pathogenese und Diagnostik." Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft **2**(2): 123-139.
- Champlaud, M. F., G. P. Lunstrum, et al. (1996). "Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment." J Cell Biol **132**(6): 1189-98.
- Chimanovitch, I., E. B. Brocker, et al. (2001). "Pemphigoid (Herpes) gestationis: New pathogenetic and diagnostic aspects." Geburtshilfe Und Frauenheilkunde **61**(5): 250-256.
- Chimanovitch, I., E. Schmidt, et al. (1999). "IgG1 and IgG3 are the major immunoglobulin subclasses targeting epitopes within the NC16A domain of BP180 in pemphigoid gestationis." J Invest Dermatol **113**(1): 140-2.
- Cianchini, G., C. Masini, et al. (2007). "Severe persistent pemphigoid gestationis: long-term remission with rituximab." Br J Dermatol **157**(2): 388-9.
- Di Zenzo, G., V. Calabresi, et al. (2007). "The intracellular and extracellular domains of BP180 antigen comprise novel epitopes targeted by pemphigoid gestationis autoantibodies." Journal of Investigative Dermatology **127**(4): 864-873.

- Djahansouzi, S., C. Nestle-Kraemling, et al. (2003). "Herpes gestationis may present itself as a paraneoplastic syndrome of choriocarcinoma - a case report." Gynecologic Oncology **89**(2): 334-337.
- do Valle Chiossi, M. P., R. S. Costa, et al. (2000). "Titration of herpes gestationis factor fixing to C3 in pemphigoid herpes gestationis associated with choriocarcinoma." Arch Dermatol **136**(1): 129-30.
- Dupont, C. (1974). "HERPES-GESTATIONIS WITH HYDATIDIFORM MOLE." Transactions of the St Johns Hospital Dermatological Society **60**(1): 103-103.
- Engineer, L., K. Bhol, et al. (2000). "Pemphigoid gestationis: A review." American Journal of Obstetrics and Gynecology **183**(2): 483-491.
- Fabbri, P., M. Caproni, et al. (2003). "The role of T lymphocytes and cytokines in the pathogenesis of pemphigoid gestationis." Br J Dermatol **148**(6): 1141-8.
- Fairley, J. A., P. W. Heintz, et al. (1995). "Expression pattern of the bullous pemphigoid-180 antigen in normal and neoplastic epithelia." Br J Dermatol **133**(3): 385-91.
- Franzke, C. W., P. Bruckner, et al. (2005). "Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology." J Biol Chem **280**(6): 4005-8.
- Garcia-Gonzalez, E., J. Castro-Llamas, et al. (1999). "Class II major histocompatibility complex typing across the ethnic barrier in pemphigoid gestationis. A study in Mexicans." Int J Dermatol **38**(1): 46-51.
- Giudice, G. J., D. J. Emery, et al. (1992). "Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180." J Invest Dermatol **99**(3): 243-50.
- Giudice, G. J., D. J. Emery, et al. (1993). "Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain." J Immunol **151**(10): 5742-50.
- Hanna, J., D. Goldman-Wohl, et al. (2006). "Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface." Nat Med **12**(9): 1065-74.
- Hanneken, S., N. Hodzic-Avdagic, et al. (2005). "[Postpartum persistent herpes gestationis. A therapeutic challenge]." Hautarzt **56**(10): 961-3.
- Harton, J. A. and J. P. Ting (2000). "Class II transactivator: mastering the art of major histocompatibility complex expression." Mol Cell Biol **20**(17): 6185-94.
- Hertl, M. (2009). "Research in practice: Treatment of autoimmune bullous disorders." J Dtsch Dermatol Ges **7**(6): 500-5.

- Hertl, M. and G. Schuler (2002). "[Bullous autoimmune dermatoses. 1: Classification]." Hautarzt **53**(3): 207-19; quiz 220-1.
- Hiby, S. E., L. Regan, et al. (2008). "Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage." Human Reproduction **23**(4): 972-976.
- Hiby, S. E., J. J. Walker, et al. (2004). "Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success." J Exp Med **200**(8): 957-65.
- Holmes, R. C. and M. M. Black (1982). "The specific dermatoses of pregnancy: a reappraisal with special emphasis on a proposed simplified clinical classification." Clin Exp Dermatol **7**(1): 65-73.
- Holmes, R. C. and M. M. Black (1983). "The specific dermatoses of pregnancy." J Am Acad Dermatol **8**(3): 405-12.
- Holmes, R. C. and M. M. Black (1984). "The fetal prognosis in pemphigoid gestationis (herpes gestationis)." Br J Dermatol **110**(1): 67-72.
- Holmes, R. C., M. M. Black, et al. (1982). "A comparative study of toxic erythema of pregnancy and herpes gestationis." Br J Dermatol **106**(5): 499-510.
- Holmes, R. C., M. M. Black, et al. (1983). "Clues to the aetiology and pathogenesis of herpes gestationis." Br J Dermatol **109**(2): 131-9.
- Holmes, R. C., D. M. Williamson, et al. (1986). "Herpes gestationis persisting for 12 years post partum." Arch Dermatol **122**(4): 375-6.
- Honeyman, J. F., G. Eguiguren, et al. (1981). "Bullous dermatoses of pregnancy." Arch Dermatol **117**(5): 264-7.
- Hopkinson, S. B., K. S. Riddelle, et al. (1992). "Cytoplasmic domain of the 180-kD bullous pemphigoid antigen, a hemidesmosomal component: molecular and cell biologic characterization." J Invest Dermatol **99**(3): 264-70.
- Huilaja, L., T. Hurskainen, et al. (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**(3): 190-200.
- Hunt, J. S., M. G. Petroff, et al. (2005). "HLA-G and immune tolerance in pregnancy." FASEB J **19**(7): 681-93.
- Hviid, T. V. (2006). "HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications." Hum Reprod Update **12**(3): 209-32.

- Ibbotson, S. H. and C. M. Lawrence (1995). "An uninvolved pregnancy in a patient after a previous episode of herpes gestationis." Arch Dermatol **131**(9): 1091-2.
- Ishitani, A., N. Sageshima, et al. (2003). "Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition." J Immunol **171**(3): 1376-84.
- Jenkins Rachel E, S., Jeff K. (2002). "Pemphigoid (herpes gestationis)." Black M, McKay editors. Obstetric and gynecologic dermatology. 2nd edition, Elsevier, Oxford: 29-37.
- Jenkins, R. E., S. Hern, et al. (1999). "Clinical features and management of 87 patients with pemphigoid gestationis." Clin Exp Dermatol **24**(4): 255-9.
- Jenkins, R. E., S. A. V. Jones, et al. (1996). "Conversion of pemphigoid gestationis to bullous pemphigoid - Two refractory cases highlighting this association." British Journal of Dermatology **135**(4): 595-598.
- Jenkins, R. E., J. K. Shornick, et al. (1993). "Pemphigoid gestationis." Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology **2**(3): 163-173.
- Jimenez, D. F., A. C. Leapley, et al. (2005). "Fetal CD34+ cells in the maternal circulation and long-term microchimerism in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*)." Transplantation **79**(2): 142-6.
- Jolles, S. (2001). "A review of high-dose intravenous immunoglobulin (hdIVIg) in the treatment of the autoimmune blistering disorders." Clin Exp Dermatol **26**(2): 127-31.
- Kelly, S. E. and M. M. Black (1989). "Pemphigoid gestationis: placental interactions." Semin Dermatol **8**(1): 12-7.
- Kelly, S. E., M. M. Black, et al. (1989). "Pemphigoid gestationis: a unique mechanism of initiation of an autoimmune response by MHC class II molecules?" J Pathol **158**(1): 81-2.
- Kelly, S. E., M. M. Black, et al. (1990). "Antigen-presenting cells in the skin and placenta in pemphigoid gestationis." Br J Dermatol **122**(5): 593-9.
- King, A., D. S. Allan, et al. (2000). "HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells." Eur J Immunol **30**(6): 1623-31.
- King, A., C. Boocock, et al. (1996). "Evidence for the expression of HLA-A-C class I mRNA and protein by human first trimester trophoblast." J Immunol **156**(6): 2068-76.
- King, A., T. D. Burrows, et al. (2000). "Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast." Placenta **21**(4): 376-87.

- Kovats, S., E. K. Main, et al. (1990). "A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts." Science **248**(4952): 220-3.
- Kreuter, A., A. Harati, et al. (2004). "Intravenous immune globulin in the treatment of persistent pemphigoid gestationis." J Am Acad Dermatol **51**(6): 1027-8.
- Lawley, T. J., G. Stingl, et al. (1978). "Fetal and maternal risk factors in herpes gestationis." Arch Dermatol **114**(4): 552-5.
- Le Bouteiller, P. and V. Mallet (1997). "HLA-G and pregnancy." Rev Reprod **2**(1): 7-13.
- Leduc, M., S. Aractingi, et al. (2009). "Fetal-cell microchimerism, lymphopoiesis, and autoimmunity." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **57**(5): 325-9.
- Lee, K. H., K. W. Wucherpfennig, et al. (2001). "Structure of a human insulin peptide-HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes." Nat Immunol **2**(6): 501-7.
- Lin, M.-S., L. A. Arteaga, et al. (2001). "Herpes gestationis." Clinics in Dermatology **19**(6): 697-702.
- Lin, M.-S., M. Gharia, et al. (1999). "Molecular Mapping of the Major Epitopes of BP180 Recognized by Herpes Gestationis Autoantibodies." Clinical Immunology **92**(3): 285-292.
- Lin, M. S., M. A. Gharia, et al. (1999). "Identification and Characterization of Epitopes Recognized by T Lymphocytes and Autoantibodies from Patients with Herpes Gestationis." J Immunol **162**(8): 4991-4997.
- Loke, Y. W. and A. King (2000). "Decidual natural-killer-cell interaction with trophoblast: cytolysis or cytokine production?" Biochem Soc Trans **28**(2): 196-8.
- Loke, Y. W., A. King, et al. (1997). "Evaluation of trophoblast HLA-G antigen with a specific monoclonal antibody." Tissue Antigens **50**(2): 135-46.
- Mascaro, J. M., Jr., M. Lecha, et al. (1995). "Fetal morbidity in herpes gestationis." Arch Dermatol **131**(10): 1209-10.
- Mayou, S. C., M. M. Black, et al. (1988). "Pemphigoid 'herpes' gestationis." Semin Dermatol **7**(2): 104-10.
- McMaster, M. T., C. L. Librach, et al. (1995). "Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts." J Immunol **154**(8): 3771-8.
- Menconi, F., M. C. Monti, et al. (2008). "Molecular amino acid signatures in the MHC class II peptide-binding pocket predispose to autoimmune thyroiditis in humans and in mice." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(37): 14034-14039.

- Menier, C., B. Riteau, et al. (2002). "MICA triggering signal for NK cell tumor lysis is counteracted by HLA-G1-mediated inhibitory signal." Int J Cancer **100**(1): 63-70.
- Messer, G. and M. Meurer (2001). "[Diagnostic significance of autoantibodies in bullous dermatoses]." Dtsch Med Wochenschr **126**(4): 79-82.
- Messer, G., H. Schirren, et al. (1993). "[Herpes gestationis: immunologic and immunogenetic aspects]." Hautarzt **44**(12): 761-6.
- Moffett-King, A. (2002). "Natural killer cells and pregnancy." Nat Rev Immunol **2**(9): 656-63.
- Moffett, A. and C. Loke (2006). "Immunology of placentation in eutherian mammals." Nat Rev Immunol **6**(8): 584-94.
- Morris, A. C., J. L. Riley, et al. (1998). "MHC class II gene silencing in trophoblast cells is caused by inhibition of CIITA expression." Am J Reprod Immunol **40**(6): 385-94.
- Morrison, L. H., R. S. Labib, et al. (1988). "Herpes gestationis autoantibodies recognize a 180-kD human epidermal antigen." J Clin Invest **81**(6): 2023-6.
- Munz, C., N. Holmes, et al. (1997). "Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G molecules inhibit NKAT3 expressing natural killer cells." J Exp Med **185**(3): 385-91.
- Murphy, K., Travers, Paul, Walport, Mark (2008). "Janeway's Immunobiology." (seventh edition).
- Murphy, S. P. and T. B. Tomasi (1998). "Absence of MHC class II antigen expression in trophoblast cells results from a lack of class II transactivator (CIITA) gene expression." Mol Reprod Dev **51**(1): 1-12.
- Nanda, A., K. Al-Saeed, et al. (2003). "Clinicopathological features and HLA tissue typing in pemphigoid gestationis patients in Kuwait." Clin Exp Dermatol **28**(3): 301-6.
- Nelson, J. L. and J. A. Hansen (1990). "Autoimmune diseases and HLA." Crit Rev Immunol **10**(4): 307-28.
- Ogilvie, P., A. Trautmann, et al. (2000). "Pemphigoid gestationis without blisters." Hautarzt **51**(1): 25-30.
- Ortonne, J. P., B. L. Hsi, et al. (1987). "Herpes gestationis factor reacts with the amniotic epithelial basement membrane." Br J Dermatol **117**(2): 147-54.
- Ostensen, M. and G. Husby (1985). "Antirheumatic drug treatment during pregnancy and lactation." Scand J Rheumatol **14**(1): 1-7.

- Oyama, N., B. S. Bhogal, et al. (2003). "Human placental amnion is a novel substrate for detecting autoantibodies in autoimmune bullous diseases by immunoblotting." Br J Dermatol **148**(5): 939-44.
- Perriard, J., F. Jaunin, et al. (1999). "IgG autoantibodies from bullous pemphigoid (BP) patients bind antigenic sites on both the extracellular and the intracellular domains of the BP antigen 180." J Invest Dermatol **112**(2): 141-7.
- Poli, A., T. Michel, et al. (2009). "CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset." Immunology **126**(4): 458-65.
- Ponte, M., C. Cantoni, et al. (1999). "Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5674-9.
- Price, P., C. Witt, et al. (1999). "The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases." Immunol Rev **167**: 257-74.
- Rachel E. Jenkins, J. K. S. (2002). "Pemphigoid (herpes gestationis)." Black M, McKay editors. Obstetric and gynecologic dermatology. 2nd edition, Elsevier, Oxford: 29-37.
- Rachel E. Jenkins, J. K. S. a. M. B. (1993). "Pemphigoid gestationis." Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology(2): 163-173.
- Rajagopalan, S. and E. O. Long (1999). "A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells." J Exp Med **189**(7): 1093-100.
- Reunala, T., J. Karvonen, et al. (1977). "Herpes gestationis. A high titre of anti-HLA-B8 antibody in the mother and pemphigoid-like immunohistological findings in the mother and the child." Br J Dermatol **96**(5): 563-8.
- Riteau, B., N. Rouas-Freiss, et al. (2001). "HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity." J Immunol **166**(8): 5018-26.
- Rouas-Freiss, N., I. Khalil-Daher, et al. (1999). "The immunotolerance role of HLA-G." Semin Cancer Biol **9**(1): 3-12.
- Sadler, T. W. (1998). "Medizinische Embryologie, Thieme, Stuttgart." (9. Auflage): 36-114.
- Schirren, H., G. Messer, et al. (1993). "[Immunogenetic findings in herpes gestationis]." Hautarzt **44**(12): 767-71.

- Schmidt, E. and D. Zillikens (2000). "Autoimmune and inherited subepidermal blistering diseases: advances in the clinic and the laboratory." Adv Dermatol **16**: 113-57; discussion 158.
- Schulze, S. (2006). "Kurzlehrbuch Embryologie, Elsevier, Urban&Fischer, München ; Jena " (1. Auflage).
- Sharkey, A. M., L. Gardner, et al. (2008). "Killer Ig-like receptor expression in uterine NK cells is biased toward recognition of HLA-C and alters with gestational age." J Immunol **181**(1): 39-46.
- Shimanovich, I., E. B. Brocker, et al. (2002). "Pemphigoid gestationis: new insights into the pathogenesis lead to novel diagnostic tools." BJOG **109**(9): 970-6.
- Shornick, J. K. (1987). "Herpes gestationis." J Am Acad Dermatol **17**(4): 539-56.
- Shornick, J. K., C. M. Artlett, et al. (1993). "Complement polymorphism in herpes gestationis: association with C4 null allele." J Am Acad Dermatol **29**(4): 545-9.
- Shornick, J. K., J. L. Bangert, et al. (1983). "Herpes gestationis: clinical and histologic features of twenty-eight cases." J Am Acad Dermatol **8**(2): 214-24.
- Shornick, J. K. and M. M. Black (1992). "Fetal risks in herpes gestationis." Journal of the American Academy of Dermatology **26**(1): 63-68.
- Shornick, J. K. and M. M. Black (1992). "Fetal risks in herpes gestationis." J Am Acad Dermatol **26**(1): 63-8.
- Shornick, J. K. and M. M. Black (1992). "Secondary autoimmune diseases in herpes gestationis (pemphigoid gestationis)." J Am Acad Dermatol **26**(4): 563-6.
- Shornick, J. K., R. E. Jenkins, et al. (1995). "Class II MHC typing in pemphigoid gestationis." Clin Exp Dermatol **20**(2): 123-6.
- Shornick, J. K., R. E. Jenkins, et al. (1993). "Anti-HLA antibodies in pemphigoid gestationis (herpes gestationis)." Br J Dermatol **129**(3): 257-9.
- Shornick, J. K., P. Stastny, et al. (1981). "High frequency of histocompatibility antigens HLA-DR3 and DR4 in herpes gestations." J Clin Invest **68**(2): 553-5.
- Shornick, J. K., P. Stastny, et al. (1983). "Paternal histocompatibility (HLA) antigens and maternal anti-HLA antibodies in herpes gestationis." J Invest Dermatol **81**(5): 407-9.
- Sitaru, C., J. Powell, et al. (2004). "Immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of pemphigoid gestationis." Obstet Gynecol **103**(4): 757-63.

- Sitaru, C., E. Schmidt, et al. (2002). "Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin." J Invest Dermatol **118**(4): 664-71.
- Svejgaard, A., N. Morling, et al. (1981). "HLA and disease associations with special reference to mechanisms." Transplant Proc **13**(1 Pt 2): 913-7.
- Taylor, M., A. Hussain, et al. (2008). "The human major histocompatibility complex and childhood leukemia: An etiological hypothesis based on molecular mimicry." Blood Cells, Molecules, and Diseases **42**(2): 129-135.
- Thoma-Uszynski, S., W. Uter, et al. (2006). "Autoreactive T and B cells from bullous pemphigoid (BP) patients recognize epitopes clustered in distinct regions of BP180 and BP230." J Immunol **176**(3): 2015-23.
- Thorsby, E. (1997). "Invited anniversary review: HLA associated diseases." Human Immunology **53**(1): 1-11.
- Tillman, W. G. (1950). "HERPES GESTATIONIS WITH HYDATIDIFORM MOLE AND CHORION EPITHELIOMA." British Medical Journal **1**(4668): 1471-1471.
- Tindall, J. G., T. H. Rea, et al. (1981). "Herpes gestationis in association with a hydatidiform mole. Immunopathologic studies." Arch Dermatol **117**(8): 510-2.
- Todd, J. A., J. I. Bell, et al. (1987). "HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus." Nature **329**(6140): 599-604.
- Trowsdale, J. and A. Moffett (2008). "NK receptor interactions with MHC class I molecules in pregnancy." Seminars in Immunology **20**(6): 317-320.
- van den Elsen, P. J., S. J. Gobin, et al. (2001). "Transcriptional control of MHC genes in fetal trophoblast cells." J Reprod Immunol **52**(1-2): 129-45.
- Waßmuth (2005, 2. akt. Auflage). "Einführung in das HLA-System " ecomed Medizin, Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm GmbH, Landsberg/Lech.
- Winchester, R. (1994). "The molecular basis of susceptibility to rheumatoid arthritis." Adv Immunol **56**: 389-466.
- Wohrl, S., A. Geusau, et al. (2003). "Pemphigoid gestationis: treatment with immunoapheresis." J Dtsch Dermatol Ges **1**(2): 126-30.
- Wucherpennig, K. W. (2001). "Insights into autoimmunity gained from structural analysis of MHC-peptide complexes." Curr Opin Immunol **13**(6): 650-6.
- Wucherpennig, K. W. (2003). "MHC-linked susceptibility to type 1 diabetes: a structural perspective." Ann N Y Acad Sci **1005**: 119-27.

- Yancey, K. B. (1990). "Herpes gestationis." Dermatol Clin **8**(4): 727-35.
- Yip, L., J. McCluskey, et al. (2006). "Immunological aspects of pregnancy." Clin Dermatol **24**(2): 84-7.
- Zillikens, D. and G. J. Giudice (1999). "BP180/type XVII collagen: its role in acquired and inherited disorders or the dermal-epidermal junction." Arch Dermatol Res **291**(4): 187-94.
- Zillikens, D., P. A. Rose, et al. (1997). "Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies." J Invest Dermatol **109**(4): 573-9.

8.4 Danksagung

Meinem Doktorvater Privatdozent Dr. med. G. Messer möchte ich für die freundliche Überlassung des interessanten Themas danken und dafür, dass er für mich trotz seiner enormen Arbeitsbelastung jederzeit ansprechbar war. Ich wusste seine persönliche, motivierende Art und seinen umfassenden Einsatz für meine Arbeit sehr zu schätzen.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. Dr. E. H. Weiß vom Department Biologie II der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanken, für die hervorragende und geduldige Unterstützung vor allem in der Auswertungs- und Korrekturphase dieser Dissertation.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. M. Spannagl, für die Möglichkeit in dem Labor für Immungenetik und Molekulare Diagnostik der Ludwig-Maximilians-Universität die HLA-Typisierungen für diese Arbeit durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. rer. biol. hum. E. Keller für die unermüdliche Hilfe bei der Planung und Durchführung der Experimente, sowie für ihre Unterstützung in der Korrekturphase dieser Doktorarbeit.

Danken möchte ich allen Mitarbeitern des Labors für Immungenetik und Molekulare Diagnostik, die mir bei der Durchführung der Experimente geholfen haben, insbesondere Dr. K. Witter, Frau Mareen Kutsch, Frau Elke Kleinschmidt-Molter, Frau Tatjana Albert, Frau Angela Lehmeier und Herrn Georg von Welser.

Herrn Dipl. biol. Günter Brännler möchte ich für die fachkundige Beratung bei der statistischen Auswertung danken.

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.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung.