

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

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

Neue immungenetische Aspekte zur Pathophysiologie
der autoimmunbedingten bullösen Dermatosen
bullöses Pemphigoid und Pemphigus vulgaris

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

Vorgelegt von

Stefanie Elisabeth Martin

aus

Landshut

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Gerald Messer
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Tim Strom Priv. Doz. Dr. Udo Kummel
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. Joachim-Ulrich Walther
Dekan:	Prof. Dr. Dietrich Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	03.04.2008

1	Einleitung und Definitionen.....	4
1.1	Einleitung	4
1.1.1	Das bullöse Pemphigoid	6
1.1.2	Pemphigus vulgaris	17
1.2	Immunologische und genetische Grundlagen.....	29
1.2.1	Immunologische Grundlagen	29
1.2.2	Genetische Grundlagen.....	35
1.3	Zielsetzung	39
2	Patienten, Material und Methoden	41
2.1	Patienten- und Kollektivbeschreibung.....	41
2.1.1	BSD-Gruppe	41
2.1.2	Vorstellung studienrelevanter Kriterien	43
2.1.3	Hinführung auf die Studie	48
2.2	Material.....	49
2.2.1	Isolation der DNA mittels Fällungsmethode.....	49
2.2.2	Isolation der DNA mittels Qiagen.....	49
2.2.3	PCR.....	50
2.2.4	Gelelektrophorese zur Amplifikatkontrolle.....	50
2.2.5	Reinigung des PCR-Amplifikats	51
2.2.6	SSCP-Gel.....	51
2.2.7	Silberfärbung	52
2.2.8	Statistische Ergebnisauswertung	52
2.3	Methoden.....	52
2.3.1	DNA-Isolierung.....	52
2.3.2	Zugabe von EDTA	53
2.3.3	Methodik zur Untersuchung des IL-4-Rezeptor-Polymorphismus	54
2.3.4	Visualisierung der Ergebnisse	57

3	Ergebnisse	60
3.1	Exemplarische Darstellung der Ergebnisse der SSCP-Gel-Auswertung.....	60
3.2	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	61
3.3	Allelverteilung des Studienkollektivs.....	63
3.3.1	Allelverteilung des IL-4-Rezeptorpolymorphismus Q576R aller untersuchten Personen.....	63
3.3.2	Allelverteilung der erfassten BP- und PV-Patienten.....	64
3.4	Untersuchung der Genotyp- und Allelfrequenzen des IL-4-Rezeptor- polymorphismus Q576R im Vergleich zu relevanten Kriterien aus dem BSD- Fragebogen	65
3.4.1	Alter bei Erkrankung	66
3.4.2	Geschlechtsverteilung.....	68
3.4.3	Schleimhautbeteiligung	72
3.4.4	Ausdehnung der Hautbeteiligung	73
3.4.5	Serumalbumin.....	75
3.4.6	Glukokortikoiddosis bei Entlassung.....	79
4	Diskussion.....	83
4.1	Ergebnisdiskussion	83
4.1.1	Genotypverteilung der Kollektive	83
4.1.2	Entstehungsalter	84
4.1.3	Geschlechtsverteilung.....	85
4.1.4	Schleimhautbeteiligung	86
4.1.5	Größe der Hautbeteiligung	86
4.1.6	Serumalbuminspiegel	87
4.1.7	Glukokortikoiddosis bei Entlassung.....	88
4.2	Diskussion des Studienaufbaus und der Statistik	89
4.2.1	Besonderheiten beim Studienaufbau	89
4.2.2	Mögliche Fehlerquellen beim Experiment	90

4.2.3	Unvollständige Datenerhebung im Fragebogen	91
4.2.4	Testbesonderheiten	91
5	Ergebniszusammenfassung und Ausblick.....	92
6	Zusammenfassung	94
7	Anhang.....	96
7.1	Literaturverzeichnis	96
7.2	Abkürzungen	126
7.3	Materialliste	127
7.3.1	Reagenzien und chemische Substanzen	127
7.3.2	Geräte und technische Hilfsmittel	128
7.3.3	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.....	129
7.4	Studienrelevante Fragebogenauszüge.....	130
7.4.1	Patienten- und Quellenidentifikation.....	130
7.4.2	Klinischer Befund bei Interview.....	132
7.4.3	Diagnosenverifizierung und Immunologisches Labor	133
7.4.4	Demographische Daten	137
7.4.5	Fragen zu Risikofaktoren	138
7.4.6	Fragen zu Haustieren.....	143
7.4.7	Therapie bei Entlassung	144
7.4.8	Patienteninformation und Einverständniserklärung	145
7.5	Lebenslauf	147
7.6	Danksagung	150

1 Einleitung und Definitionen

1.1 Einleitung

Die bullösen Dermatosen werden als chronisch verlaufende Hauterkrankungen unterschiedlicher Genese zusammengefasst, deren Primäreffloreszenzen Blasen sind. Darunter fallen sowohl Genodermatosen wie beispielsweise die verschiedenen hereditären Epidermolysen als auch die autoimmunologisch bedingten Hauterkrankungen [32, 42, 91, 119, 269].

Die Klassifikation in verschiedene Formen ergibt sich durch die Lokalisation der Spaltbildung (siehe Tabelle 1, Seite 5). Man unterscheidet hierbei orientierend zwischen bullösen Dermatosen mit intraepidermaler (desmosomaler) Ausbildung der Blasen wie beim Pemphigus und subepidermale, hemidesmosomalem Adhäsionsverlust wie beim Pemphigoid und subbasaler Auftrennung wie bei der Epidermolysis bullosa acquisita.

Hauptvertreter bei den Erkrankungen der Pemphigusgruppe ist der Pemphigus vulgaris (PV). Als Varianten wurden der Pemphigus vegetans [4] und der Pemphigus herpetiformis beschrieben. Daneben zählt zu dieser Gruppe auch der Pemphigus foliaceus mit seinen Sonderformen Brasilianischer Pemphigus foliaceus (*Fogo selvagem*) [162] und Pemphigus erythematous (*Senear-Usher*). Als besonders früh auftretende Krankheitsformen gelten der neonatale [279] und juvenile [182] Pemphigus foliaceus. Besondere Formen des Pemphigus sind der IgA-Pemphigus mit seinen Subformen, der paraneoplastische Pemphigus und der arzneimittelinduzierte Pemphigus.

Bei den Pemphigoid-Erkrankungen, bei denen der Adhäsionsverlust subepidermal liegt, findet sich als Hauptvertreter das bullöse Pemphigoid (BP). Von diesem gibt es zahlreiche Varianten wie z.B. das urtikarielle, das vesikuläre, das lokalisierte BP und das Pemphigoid nodularis. Weiterhin gehört in diese Gruppe ebenso das Pemphigoid gestationis (*Herpes gestationis*) und das vernarbende Schleimhautpemphigoid (*Cicatricial pemphigoid*).

Darüberhinaus zählen zu den bullösen Dermatosen mit subepidermaler Spaltbildung die Epidermolysis bullosa acquisita, die Dermatitis herpetiformis Duhring und die lineare IgA-Dermatose mit juveniler und adulter Form [42].

Braun-Falco und Mitarbeiter waren eine der ersten Arbeitsgruppen, die 1965 begonnen hatten, mit Hilfe der Elektronenmikroskopie die Dynamik der Blasenbildung bei den erworbenen bullösen Dermatosen zu untersuchen [43, 44].

- A. Intraepidermaler Adhäsionsverlust
 - 1. Pemphigus vulgaris
 - 1.1 Pemphigus vegetans (Typ Neumann, Typ Hallopeau)
 - 1.2 Pemphigus herpetiformis
 - 2. Pemphigus foliaceus
 - 2.1 Fogo selvagem (endemische Variante)
 - 2.2 Pemphigus erythematosus (*Senear-Usher*)
 - 2.3 Neonataler Pemphigus foliaceus
 - 2.4 Juveniler Pemphigus foliaceus
 - 3. IgA-Pemphigus
 - 3.1 Subkorneale pustulöse Dermatoze
 - 3.2 Interepidermale neutrophile Dermatoze
 - 4. Sonderformen
 - 4.1 Paraneoplastischer Pemphigus
 - 4.2 Arzneimittelinduzierter Pemphigus
- B. Subepidermaler Adhäsionsverlust
 - 1. Pemphigoid
 - 1.1 Bullöses Pemphigoid
 - 1.2 Pemphigoid gestationis
 - 1.3 Vernarbendes Schleimhautpemphigoid
 - 1.4 Sonstige Pemphigoid-Varianten
 - 2. Lineare IgA-Dermatoze
 - 2.1 Chronisch bullöse Dermatoze im Kindesalter
 - 2.2 Adulte Form
- C. Subbasaler Adhäsionsverlust
 - 1. Epidermolysis bullosa aquista
 - 2. Dermatitis herpetiformis Duhring

Tabelle 1: Einteilung der autoimmunbullösen Dermatosen nach dem Ort der Spaltbildung.

1.1.1 Das bullöse Pemphigoid

Das bullöse Pemphigoid (BP) wurde zuerst als Pemphigus mit subepidermaler Ausbildung des Spalts definiert [43]. Später konnte gezeigt werden, dass es sich beim BP um eine komplexe, immunologisch mediierte Erkrankung handelt. Das bullöse Pemphigoid wurde 1967 von Jordan et al. als Autoimmunerkrankung eingestuft [141]. Weiterführende Untersuchungen bewiesen, dass Auto-Antikörper aus der Klasse IgG eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese dieser Erkrankung spielen [141, 152, 298].

1.1.1.1 Klinik

In einer nicht-bullösen Prodromalphase leiden die Patienten unter Juckreiz und exkorierten papulovesikulären oder urtikariellen Plaques, die mehrere Monate bestehen können. Die anschließend auftretenden, prallen Blasen (Abbildung 1, Seite 6) finden sich beim BP meist am unteren Abdomen, an den Innenseiten der Oberschenkel beziehungsweise der Unterarme und an den Intertrigines. Bei 15 - 30% der Erkrankten ist nur eine Körperregion betroffen. Eine Schleimhautbeteiligung findet sich zu 25% – meist in der Mundhöhle, selten an den Genitalien oder den Konjunktiven [152, 298]. 98% der Patienten leiden unter einem mehr oder weniger intensiven Juckreiz. Die Blasen heilen in der Regel narbenlos ab [152].



Abbildung 1: Pralle und schlaffe Blasen als BP-Effloreszenzen des bullösen Pemphigoids.

1.1.1.2 Diagnosestellung

Zur Diagnose und Differenzierung der bullösen Dermatosen dienen klinische Daten, die dermatohistopathologische Untersuchung und die direkte sowie indirekte Immunfluoreszenzuntersuchung.

So wird beim klinischen Verdacht auf eine blasenbildende Hauterkrankung ein entnommenes Hautpräparat histologisch untersucht, um die Lokalisation der Blasenbildung zu untersuchen. Weiterführend werden in der direkten Immunfluoreszenzuntersuchung (DIF) gewebegebundene Auto-Antikörper nachgewiesen. Als Bestätigungstest schließt sich eine indirekte Immunfluoreszenzuntersuchung (IIF) an. Diese beweist das Vorliegen von zirkulierenden Auto-Antikörpern.

Beim BP liegt der Blasenspalt (Abbildung 2, Seite 7) im subepidermalen Bereich. Die diagnostisch wichtigen Auto-Antikörper IgG beziehungsweise die Komplementkomponente C3, die sich in 90% interzellulär an der dermoepidermalen Basalmembranzzone ablagern, wurden erstmals 1967 von Jordon et al. nachgewiesen, später wurden die Untersuchungen mehrfach bestätigt [141, 152, 298].

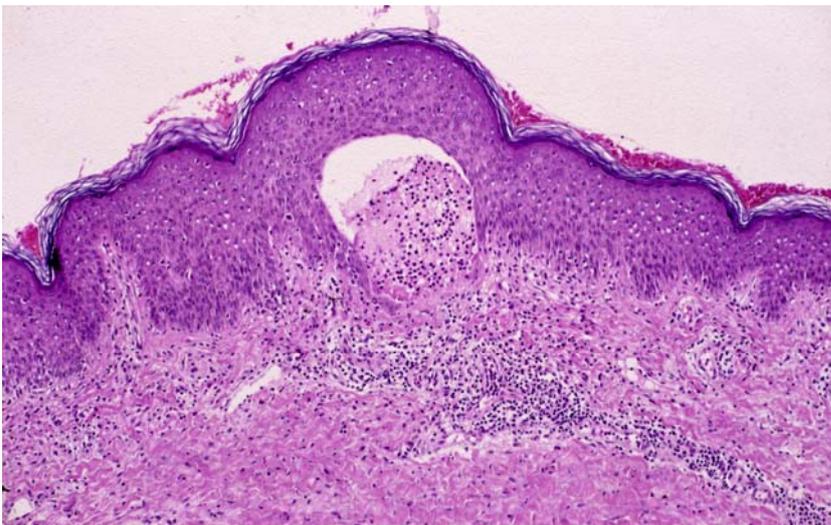


Abbildung 2: Subepidermale Spaltbildung bei BP im histologischen Bild.

Die Immunfluoreszenz-Diagnostik ist dabei ausschlaggebend, Differentialdiagnosen wie Dermatitis herpetiformis, lineare IgA-Dermatose und Epidermolysis bullosa acqvista zu treffen [42].

In der DIF können beim BP periläsional an der Basalmembranzzone lineare Ablagerungen von C3 und/oder IgG nachgewiesen werden [152].

In der IIF lassen sich bei bis zu 90% der BP-Patienten zirkulierende Auto-Antikörper vom Typ IgG1, IgG2, IgG4 oder selten IgA, IgM oder IgE nachweisen [35, 151, 255].

Mittels ELISA und Westernblot konnte nachgewiesen werden, dass die humorale Immunantwort gegen das BP-Hauptantigen BP180 überwiegend durch IgG4 [74, 270] und IgE vermittelt wird [74]. IgE findet sich vorwiegend bei sehr schweren Verläufen [71]. IgG1-Antikörper lassen sich in geringerem Maße und vor allem bei chronischer BP-Erkrankung ebenso nachweisen [113, 270]. IgG2 und IgG3 spielen eine geringere Rolle [74].

Mittels BP180-NC16A-ELISA konnten Schmidt et al. nachweisen, dass die Krankheitsaktivität mit dem Serumspiegel der Auto-Antikörper gegen das BP-Antigen BP180-NC16A, nicht dagegen mit dem Auto-Antikörpertiter der IIF auf NaCl-separierter Spalthaut assoziiert werden kann [243]. Als Erklärung dazu dient die Tatsache, dass beim BP die Immunfluoreszenz-Reaktivität vorwiegend durch Antikörper gegen BP230 und weniger gegen BP180 vermittelt wird [216]. Es besteht ebenfalls eine Assoziation von der BP180-NC16A-Reaktivität mit der therapeutisch notwendigen oralen Steroiddosis [243]. Der BP180-NC16A-ELISA ist daher ein geeignetes Instrument, den Krankheitsverlauf und die Therapie des BP zu monitoren und zu kontrollieren.

1.1.1.3 Epidemiologie

Das bullöse Pemphigoid ist die häufigste bullöse Autoimmunerkrankung in Zentraleuropa [29, 145, 302]. Die Inzidenzen sind regional unterschiedlich. So gibt es in Frankreich und Deutschland durchschnittlich 7 und in der Schweiz sogar 25 Neuerkrankungen pro eine Million Einwohner und Jahr [30, 178, 302].

Von dieser blasenbildenden Hauterkrankung sind in erster Linie Menschen höheren Lebensalters betroffen [296]. Der Altersdurchschnitt wird mit etwa 77 Jahren angegeben [42]. Wenn man die Neuerkrankungsraten hinsichtlich der Altersverteilung betrachtet, so scheinen die Inzidenzen für Menschen über 60 Jahren rapide anzusteigen. Bei den unter 60-jährigen liegt die Inzidenz mit 0.6 deutlich niedriger im Vergleich zu den bis zu 400 Neuerkrankungen pro eine Million Einwohner und Jahr bei den über 90-jährigen Personen. Da sich in den letzten Jahrzehnten ein ständiges Ansteigen der durchschnittlichen Lebenserwartung der europäischen Bevölkerung abgezeichnet hat, ist in den kommenden Jahren mit mehr jährlichen Neuerkrankungen zu rechnen [145].

Während der letzten Jahre haben sich die Erkenntnisse über einen Geschlechtsunterschied hinsichtlich der BP-Erkrankung gewandelt. In älteren Studien finden sich Hinweise, dass

mehr Frauen als Männer am BP erkranken [95, 168, 230, 232, 273]. In einer Veröffentlichung von Jung et al. 1999 konnte gezeigt werden, dass alterskorrigierten Berechnungen zufolge Männer ein 1.9-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko gegenüber Frauen haben [145].

1.1.1.4 Therapie und Prognose

Eine lokale Therapie mit glukokortikoidhaltigen Salben und desinfizierenden Maßnahmen zur Austrocknung der Blasen und Verhinderung einer sekundären Infektion ist nur in Ausnahmefällen ausreichend. Allerdings wurde in einer aktuellen Studie aus dem Jahre 2004 gezeigt werden, dass bei einer Größe des betroffenen Hautareals unter 20% topische Glukokortikoide zur Heilung ausreichen [263]. Von Joly et al. gibt es Hinweise, dass topische Applikation von Glukokortikoiden eine sehr effektive und zuverlässige Behandlungsmöglichkeit bei einer BP-Erkrankung ist [137]. In einer Publikation von 2005 konnten sie aufzeigen, dass vor allem ältere Patienten von einer topischen Anwendung profitieren [136].

Der größte Teil der Patienten wird mit systemischen Glukokortikoidgaben behandelt, womit sich gute Erfolge erzielen lassen. Vor dem Einsatz von Glukokortikoiden lag die Mortalitätsrate bei 40% [41]. Die mittlere notwendige Dosierung, die vom Schweregrad der Erkrankung abhängt, liegt bei 0.5 - 1 mg/kg Körpergewicht pro Tag.

Zeigt die Glukokortikoidtherapie nicht den erwünschten Erfolg, so können eine Reihe von adjuvanten Therapien Anwendung finden. Hierbei kommen Immunsuppressiva wie z. B. Azathioprin, Methotrexat, Cyclophosphamid oder Cyclosporin A zum Einsatz. In einer retrospektiven Studie von Schmidt et al. konnte 2005 ein Therapieschema mit Dapsone in Kombination mit systemischen und topischen Glukokortikoide als effektive Behandlungsmöglichkeit hervorgehoben werden [248].

Es gibt Hinweise, dass Immunsuppressiva bei bestimmter Genkonstellation (HLA-B7-positiv) nur wenig Erfolg zeigen [240]. Daher erscheint eine genetische Abklärung im Vorfeld hilfreich oder kann zumindest einen fehlenden Behandlungserfolg erklären.

Desweiteren wurden Wirkstoffe wie Nicotinamid und Zink [83], Tetracyclin und Minocyclin [148, 156] erfolgreich in der BP-Therapie eingesetzt.

Die Gabe von Makrolidantibiotika (Erythromycin oder Tetrazyklin) allein oder in Kombination mit Nicotinsäure kann bei gering ausgeprägtem BP ebenfalls erwogen werden [187]. Sinnvoll ist hier allerdings eine Ergänzung mit topischen Glukokortikoiden [125].

In therapieresistenten Fällen oder bei besonders ausgeprägtem Befall lassen sich mit Plasmapherese [98] gute Therapieerfolge erzielen. Das Herausfiltern der pathogenen Auto-

Antikörper aus dem Blut mit Hilfe dieser Methode hat sich in Kombination mit niedrigdosierten Glukokortikoiden als ebenso erfolgreich erwiesen [231].

Bei schweren Fällen von BP wie auch bei anderen dermatologischen Autoimmunerkrankungen kann aber auch die hochdosierte Gabe von Immunglobulin G (IvIg) [2, 3, 78] erfolgversprechend sein.

Ahmed et al. konnten in einer vergleichenden Studie zwischen konventioneller immunsuppressiver Therapie und der Gabe von intravenösen Immunglobulinen (IvIg) bei oralem Schleimhautpemphigoid mit der Immunglobulintherapie bessere Erfolge erzielen. Die so behandelten Patienten hatten eine kürzere Therapiedauer, seltener Rezidive, höhere Remissionsraten, weniger Nebenwirkungen, keine zusätzliche Integumentbeteiligung und eine bessere Lebensqualität [4].

In neuerer Zeit wird auch Rituximab ein Behandlungserfolg zugeschrieben [246].

Bisher ist wenig über prognostische Faktoren bekannt, die auf BP als häufigste blasenbildende Autoimmunerkrankung in Zentraleuropa Einfluss nehmen [29, 274, 302]. In einer Studie von Rzany et al. konnte eine höhere Glukokortikoiddosis in Kombination mit einem niedrigen Serumalbuminspiegel als Risikofaktor für Letalität im ersten Jahr nach der stationären Erstbehandlung detektiert werden [235].

Nach Pereyo et al. ist der Verlauf des BP in der Regel benigner Natur und selten lebensbedrohlich [220]. Dennoch schien in einer Studie von Bernard et al. 1995 die Letalität von BP-Patienten erhöht zu sein. Dies hängt mit dem Vorhandensein von Antikörpern gegen das BP180-Autoantigen zusammen. Die Antikörper gegen das BP230-Antigen spielen wahrscheinlich eine weniger ausgeprägte Rolle [30]. Es gibt Studienergebnisse darüber, dass beim BP die höchste Mortalitätsrate (49%) in den ersten zwei Jahren nach Diagnosestellung besteht [29, 231].

Die bullösen Dermatosen können durch Komplikationen wie virale und bakterielle Superinfektionen, Sepsis, Gewichtsverlust, kardiovaskuläre Symptomaten, die aus dem klinischen Krankheitsverlauf oder den immunsuppressiven beziehungsweise antiproliferativen Therapeutika resultieren, lebensbedrohlich werden [29, 232].

Neue Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass BP-Patienten ein erhöhtes Malignomrisiko (v.a. Bronchial-, Colon-, Magenkarzinom) aufweisen. Daher erscheint ein genaues Tumorscreening bei der Diagnosestellung wichtig [234].

1.1.1.5 Pathogenese

Erste Hinweise stammten von der Arbeitsgruppe um Jordan, dass es sich beim BP um eine Autoimmunerkrankung handelt, bei der Antikörper gegen körpereigene Zellen gebildet werden [141].

Die Auto-Antikörper des BP, die im Blut zirkulieren, binden entlang der Basalmembranzzone (BMZ) an Antigene (siehe Abbildung 3, Seite 11) und schließlich kommt es dort durch entzündliche Veränderungen und Adhäsionsverlust zur Blasenbildung.

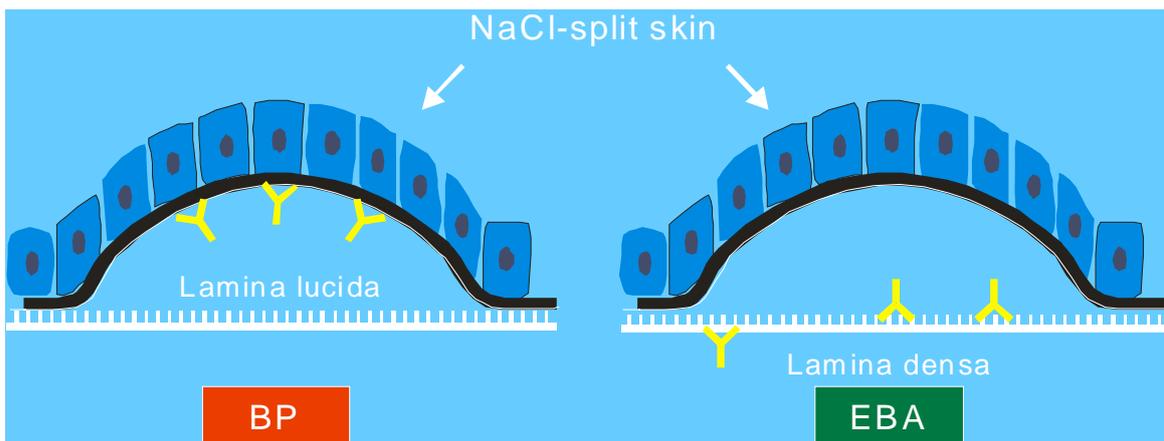


Abbildung 3: Antigen-mapping bei BP. Hier binden die Antikörper an die Antigene am Blasendach entlang der Basalmembranzzone. Bei der Epidemolysis bullosa acquisita (EBA) dagegen binden die Antikörper an die Lamina densa am Blasenboden.

In der direkten Immunfluoreszenz werden die an die BMZ der frischen periläsionalen Haut gebundenen Antikörper sichtbar gemacht (siehe Abbildung 4, Seite 11) [141].

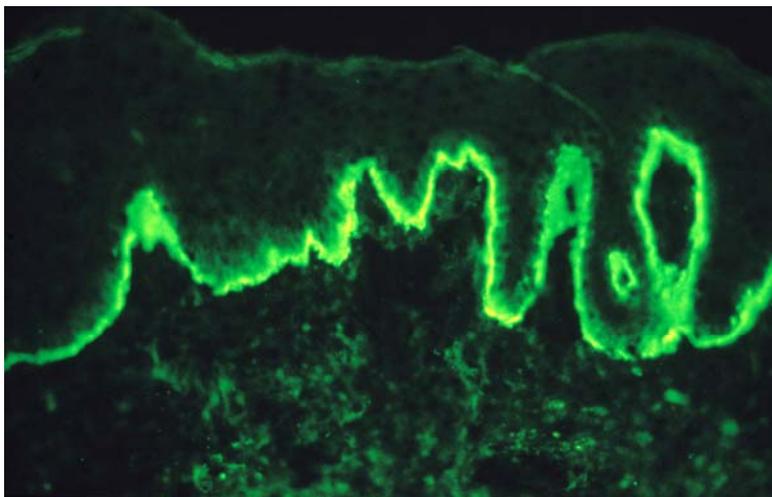


Abbildung 4: An der Basalmembran anliegende Auto-Antikörper bei BP in der direkten Immunfluoreszenz (DIF).

Anders als beim PV können die BP-Auto-Antikörper nur dann einen subepidermalen Spalt bedingen, wenn gleichzeitig Komplement (C3) aktiviert und Entzündungszellen (Leukozyten) in der Haut aktiviert werden [87, 198]. Das dermale Infiltrat besteht hauptsächlich aus aktivierten T-Lymphozyten mit einem Verhältnis CD4/CD8 von 2 : 1, sowie Monozyten/Makrophagen und Granulozyten [18]. Für die Entstehung des Spalts selbst werden letztendlich lytische Enzyme verantwortlich gemacht, die von diesen Zellen freigesetzt werden können [198].

Als Zielantigen der Antikörper beim BP wurde zuerst ein 230 kD messendes Protein angesehen, das mittels Auto-Immunpräzipitation und Westernblot erstmals 1981 nachgewiesen werden konnte. Bezeichnet wurde es als BP230-Antigen (Synonyme: BP-Antigen 1, BPAG1) [261]. 1986 wurde ein zweites Zielantigen, das BP180-Antigen (Synonyme: BP-Antigen 2, BPAG2, Kollagen Typ XVII), detektiert [163].

BP230, das zur Familie der Plakine gehört, ist intrazellulär lokalisiert und ein Bestandteil der Hemidesmosomen. Das Carboxylende des Proteins bindet an die Keratinfilamente des Zytoplasmas während der N-Terminus vermutlich mit BP180 und der β_4 -Kette des $\alpha_6\beta_4$ -Integrins interagiert [38]. Die Immunantwort gegen BP230 wird nicht nur hauptsächlich von IgG4, sondern – bei schwerem Krankheitsverlauf – auch von IgE vermittelt [71]. Vermutlich kommt hier den BP180-reaktiven T-Helfer-Zellen vom Typ 2 ein großer Anteil zu, da die Immunregulation von autoreaktiven Th2-Zellen vorgenommen wird, die im aktiven Krankheitsstadium nachweisbar sind [47, 113]. Die BP180-reaktiven Th2-Lymphozyten aktivieren die B-Zellen, die daraufhin Antikörper produzieren [113].

Man geht davon aus, dass die Antikörper gegen BP230 eine Entzündungsreaktion induzieren, die bei der Pathogenese des BP mitwirkt.

In der Abbildung 5 (Seite 13) sind die verschiedenen Lokalisationen der Proteine BP180 und BP230 im Zellverband dargestellt.

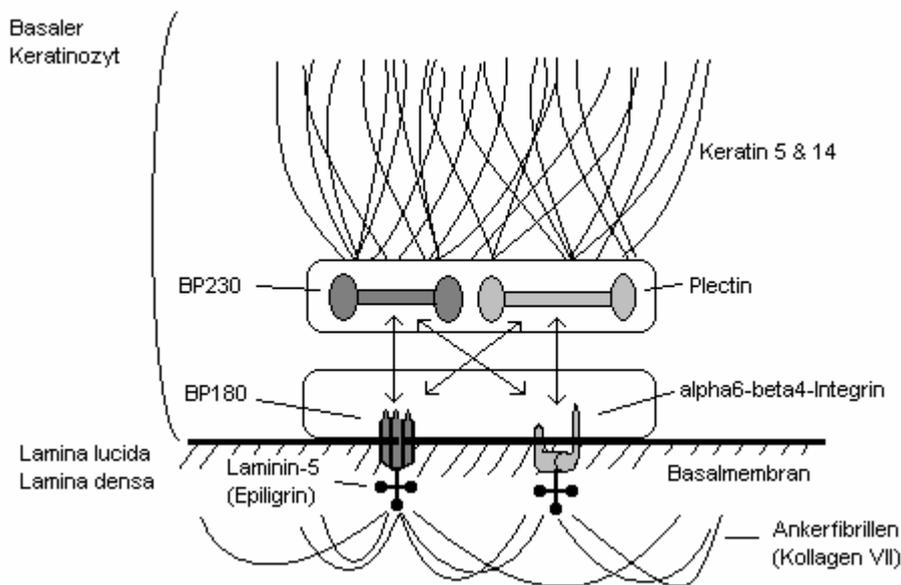


Abbildung 5: Dargestellt ist die Verankerung eines Keratinozyten an der Basalmembran. Es handelt sich um die dermoepidermale Junctionszone (Basalmembranzone). Repräsentiert werden die Autoantigene BP180 und BP230 der Pemphigoid-Gruppe sowie das Antigen der EBA, Kollagen Typ VII (Ankerfibrillen).

Bei allen Erkrankungen der Pemphigoid-Gruppe finden sich im Serum der Patienten ein krankheitsspezifisches Auto-Antikörperprofil und unterschiedliche Zielantigene (siehe Tabelle 2, Seite 13).

Erkrankung	Zielantigen	Auto-Ak	Lokalisation
Bullöses Pemphigoid	BP180	IgG1, IgG4, IgA, IgE	Hemidesmosom
	BP230	IgG1, IgG4, IgE	Hemidesmosom
Vernarbendes Pemphigoid	BP180, Laminin-5	IgG1, IgG4, IgA, IgE	Hemidesmosom
Pemphigoid gestationis	BP180	IgG1, IgG4	Hemidesmosom

Tabelle 2: Auto-Antikörperprofil und Zielantigene bei den Erkrankungen der Pemphigoidgruppe. Aufgeführt sind die verschiedenen Zielantigene, Auto-Antikörper (Auto-Ak) sowie die jeweilige Lokalisation für die einzelnen Erkrankungen (bullöses Pemphigoid, vernarbendes Pemphigoid und Pemphigoid gestationis) [113].

Der eigentliche pathogenetische Beitrag der beiden verschiedenen Antigene BP180 beziehungsweise BP230 lässt noch viele Fragen offen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass BP230-defiziente Tiere lediglich eine erhöhte Hautfragilität aufweisen, es jedoch zu keiner spontanen Blasenbildung kommt [100].

Bei Kaninchen, die mit einem rekombinanten Fragment des BP230 immunisiert wurden und daraufhin Antikörper bildeten, konnte bei zusätzlichem Trauma eine starke Entzündungsreaktion festgestellt werden. Es kam hier zwar zur Präzipitation an der dermoepidermalen Junktionszone, aber nicht zum Adhäsionsverlust beziehungsweise zur Entwicklung von Blasen [100]. Für die Mitwirkung von Entzündungsmediatoren wie IL-8, CD4 und CD8 sind die Th2-Zellen verantwortlich. Diese wichtigen Botenstoffe konnten in der Blasenflüssigkeit von BP-Patienten nachgewiesen werden [264].

Beim BP180 liegt der N-Terminus intra- und der C-Terminus extrazellulär [91]. Der immundominante Abschnitt von BP180 ist die NC16A-Domäne, die sich extrazellulär direkt an die Zytoplasmamembran anschließt [300]. In elektronenmikroskopischen Studien konnte gezeigt werden, dass BP180 N-terminal mit dem hemidesmosomalen Plaque in Verbindung steht [123, 179]. Über den intrazellulären Anteil des BP180-Proteins, welches heute als Kollagen Typ XVII bezeichnet wird, bestehen Verbindungen mit dem $\alpha_6\beta_4$ -Integrin, BP230 und Keratin 5, 14 und 18 [10, 38, 119] (siehe Abbildung 5, Seite 13).

In verschiedenen Studien konnte mittels BP180-NC16A-ELISA und Westernblot ein Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität beziehungsweise -intensität und dem Serumspiegel von BP180-Auto-Antikörpern nachgewiesen werden [29, 101, 243, 299, 300]. Daher kann man durch BP180-Auto-Antikörperbestimmung im Serum auf relativ einfache Weise den Krankheitsverlauf kontrollieren und dokumentieren. Hieraus ergeben sich hinsichtlich der Prognose und Therapiemodulation wichtige Informationen.

Dem BP180-Protein kommt aber auch bei anderen Erkrankungen eine große Bedeutung zu. Bei der linearen IgA-Dermatose (LAD) gehören die Auto-Antikörper der IgA-Klasse an und sind ebenfalls meist gegen BP180 gerichtet. Es entsteht hierbei ebenfalls eine subepidermale Ausbildung von Blasen. Der pathogenetisch bedeutsamste Teil für die Bindung scheint hier allerdings am C-Terminus des BP-Proteins zu liegen [89].

Dagegen binden beim vernarbenden Pemphigoid (*Cicatricial pemphigoid*) die wesentlichen IgA- und IgG-Auto-Antikörper an beide intra- und extrazellulären Domänen des BP180-Antigens [250].

Das Serum eines BP-Patienten kann sowohl BP180- als auch BP230-Antikörper oder nur einen der beiden Auto-Antikörper beinhalten. Diesbezüglich wurden bei Patienten, bei denen nur BP180-Antikörper nachgewiesen wurden, ausgeprägtere Läsionen und eine erhöhte Letalität festgestellt [163].

Hinsichtlich des genauen Mechanismus, der zur Entstehung der Blasen führt, existieren verschiedene Theorien:

Jordon et al. gehen davon aus, dass nach Stimulation von B-Zell- beziehungsweise Plasmazellklonen eine Antikörperbindung von IgG an das Pemphigoidantigen stattfindet. Durch diese Komplexbildung wird Komplement aktiviert, das zu einer Mastzelldegranulation führt (ECF-A, HMW-NCF, ESM, Histamin, Enzyme). Dadurch werden eosinophile Granulozyten herangelockt, die zusammen mit polymorphonukleären Leukozyten an die dermoepidermale Verbindungszone binden. Die Blasen entstehen durch direkte zytotoxische Effekte oder über die Einwirkung löslicher Substanzen. Die Mastzellgranulation wird durch Sekretion von HRF (*Histamin-releasing-factor*) noch zusätzlich verstärkt [142].

Kitajima et al. verfolgten die Theorie, dass es durch die Bindung von IgG an das BP180-Protein zu einer Internalisierung der gebildeten Komplexe kommt. Dadurch können die BP180-Moleküle, die sich in der apikolateralen Membran befinden, nicht mehr zur Bildung von Hemidesmosomen herangezogen werden und führen nicht mehr konsequent zum dermoepidermalen Kontakt. Durch die Bindung von IgG an die NC16A-Domäne ist es BP180 nur noch eingeschränkt möglich, sich mit den hemidesmosomalen Strukturen zu verbinden [154].

An dieser Stelle erscheint der Hinweis interessant, dass ein erhöhter IgE-Serumspiegel gerade bei BP-Erkrankten mit schwerem Verlauf sehr typisch ist [215, 244]. Es gibt Berichte über lineare IgE-Ablagerungen entlang der Basalmembran [215] sowie IgE-Reaktivität gegen BP180 und BP230 [71, 74, 113].

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass Kaninchen-Antikörper gegen murines BP180 nach Injektion in neonatale Mäuse zur Bildung von subepidermalen Blasen führt und dem klinischen Bild des Pemphigoids entspricht. Vermittelt wird diese Reaktion durch das Komplementsystem, das durch die Antigen-Antikörper-Reaktion aktiviert wird. Hierbei werden proteolytische Enzyme wie Proteasen, Matrixmetalloproteinasen und Elastasen freigesetzt, die vermutlich zur Abspaltung des extrazellulären Anteils des BP180-Proteins führen. Wesentlich für den Versuchserfolg war neben einem funktionierenden Komplementsystem auch das Vorliegen von Elastase neutrophiler Granulozyten und ein intaktes Plasminsystem [169, 170].

Eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung der Immunreaktionen spielen zelluläre Botenstoffe, wie z. B. Entzündungsmediatoren und Zytokine. In den Blasenflüssigkeiten konnten bisher erhöhte Spiegel folgender verschiedener Zytokine nachgewiesen werden: TNF α [19,

301], IFN γ [19], IL-1 β [19, 249], IL-2 [19], IL-4 [19, 242], IL-5 [19], IL-6 [19, 242], IL-8 [19, 241], IL-10 [242] und sCD₂₃ [244]. Ameglio et al. konnten einen Zusammenhang von TNF α , IL-1 β , IL-8 und IL-5 im Blaseninhalt mit der Krankheitsaktivität der Patienten zeigen [19].

Im Serum von BP-Patienten können erhöhte Spiegel von IL-6 und IL-8 nachgewiesen werden, die ebenfalls mit der Krankheitsschwere assoziiert sind [132].

Meistens tritt das bullöse Pemphigoid spontan auf, d.h. ein auslösender Faktor kann nicht gefunden werden [275].

Bei ca. 15% der Patienten lassen sich Auslöser finden [275]. In erster Linie liegt das Augenmerk hierbei auf Medikamenten. Eine wichtige Rolle bei der Auslösung eines BP spielen Benzothiadiazide, Aldosteronantagonisten, Furosemid, ACE-Hemmer, Neuroleptika [24, 243], Penicillamin [46, 281] und Chloroquin [192]. Der genaue pathophysiologische Zusammenhang sowie die Epidemiologie sind allerdings noch ungeklärt.

Aber auch UV-Strahlung [221], PUVA-Therapie [42, 135] und Röntgenstrahlung scheinen ein BP verursachen zu können [42].

Der pharmakologische Wirkstoff Terbinafin, der älteren Menschen häufig als Antimykotikum verschrieben wird, scheint einem Fallbericht aus dem Jahre 2003 zufolge, eine BP-Erkrankung auslösen zu können [12].

Es gibt in der Literatur Hinweise, dass beispielsweise Skabies eine Autoimmundermatose wie BP auslösen kann. Auf der anderen Seite wurde auch beschrieben, dass bullöse Formen der Skabies BP imitieren können, was differentialdiagnostisch und therapeutisch sehr wichtig ist. Als Ursache wurde angenommen, dass bei Parasitenpersistenz eine Th2-vermittelte Immunreaktion ausgelöst wird, die über IL-5 und Eosinophile und in Folge der Sekretion von proteolytischen Enzymen nahe der Basalmembranzzone zur Entstehung von Blasen führt [37].

Auch bei Patienten, die an Colitis ulcerosa erkrankt sind, werden BP-Erkrankungen beobachtet [253].

Einige Studien weisen darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen der Entstehung eines BP und einer Malignomkrankung beziehungsweise einer vorangegangenen Krebstherapie besteht [1, 20, 34, 79, 134, 197, 208, 234]. Unklar ist hierbei allerdings, ob die verwendeten Chemotherapeutika oder der Tumor selbst für die Entstehung des BP verantwortlich sind.

Impfungen gerieten ebenfalls in Verdacht, bei der Auslösung dieser Autoimmunerkrankung eine Rolle zu spielen. So sind in der Literatur Fälle beschrieben, dass durch Grippe [36, 84] und Tetanusimpfung [84, 275] ein BP erstmalig auftreten oder verstärkt werden kann. Als Ursache wird die plötzliche Aktivierung der spezifischen Immunreaktion des Abwehrsystems vermutet [275].

Das gelegentlich bei Schwangeren im 2. oder 3. Trimenon auftretende Pemphigoid gestationis kann durch transplazentäre Übertragung von mütterlichen Auto-Antikörpern an das Kind weitergegeben werden. Das Neugeborene leidet dann an einem generalisierten Exanthem und erythematöser Blasenbildung, dem Herpes gestationis neonatalis.

1.1.1.6 Genetik

Auf genetischer Ebene wurde bei BP eine Assoziation mit Allelen von humanen Leukozytenantigenen (HLA) beschrieben. So scheint zwischen dem HLA-Typ DQ7 und dem Auftreten eines BP bei männlichen Personen eine Assoziation zu bestehen [23, 72]. Die Arbeitsgruppen um Haustein beziehungsweise Lohrlich konnten einen Zusammenhang zwischen HLA-Aw24 und der BP-Erkrankung zeigen [110, 171]. Okazaki et al. wiesen auf ethnische Unterschiede hinsichtlich der genetischen Prädisposition für BP hin. Bei der Untersuchung japanischer BP-Patienten konnte er eine Häufung von HLA-DRB1*04 oder DRB1*1101 nachweisen. Dagegen scheint bei kaukasischen BP-Patienten die Erkrankung mit HLA-DQB1*0301 assoziiert zu sein [209], was Delgado et al. an einem amerikanischen Kollektiv bestätigen konnte [72].

Die Häufung des HLA-Typs DQB1*0301 spielt vermutlich eine Rolle bei der Präsentation von immundominanten Epitopen des BP180 an die autoreaktiven T-Lymphozyten. In einer Studie konnten CD4+BP180-spezifische T-Lymphozyten nachgewiesen werden, die mit dem HLA-DQB1*0301-Allel assoziiert waren. Findet sich bei gesunden Personen dieser HLA-Typ, so werden in vitro BP180-reaktive T-Zell-Antworten entwickelt [47].

1.1.2 Pemphigus vulgaris

Pemphigus vulgaris (PV) kann als schwere Erkrankung der Haut und Schleimhaut entstehen. Typisch sind schlaffe, intradermale, akantolytische Blasen auf meist unveränderter Haut, die bald platzen und schmerzhaft Erosionen sowie Krusten mit geringer Heilungstendenz hinterlassen.

Zur Gruppe der Pemphiguserkrankungen gehören neben dem Pemphigus vulgaris auch der Pemphigus foliaceus, der Pemphigus vegetans, der Pemphigus erythematosus, der paraneoplastische Pemphigus und der endemische brasilianische Pemphigus foliaceus (siehe Tabelle 1, Seite 5). Der PV nimmt mit etwa 73% den größten Anteil ein [25].

1.1.2.1 Klinik

Der PV fällt häufig zuerst Zahnärzten und HNO-Ärzten auf, da meist initial eine Beteiligung der Mundschleimhaut auftritt (siehe Abbildung 6, Seite 18). Braun-Falco spricht sogar von der Hälfte der Patienten, die anfangs nur unter Blasen an der Mundschleimhaut leiden, die häufig als Aphthen fehlgedeutet werden [41].



Abbildung 6: Blasen und Erosionen an der Mundschleimhaut bei PV.

Erst später ist das Integument betroffen. Es lassen sich schlaffe Blasen auf normaler oder erythematös veränderter Haut erkennen. Die Blasendecke reißt schnell ein und es bilden sich Erosionen und Krusten (siehe Abbildung 7, Seite 19) [245]. Der Juckreiz ist eher schwach ausgeprägt [140].



Abbildung 7: PV-typische Erosionen und Krusten am gesamten Integument.

1.1.2.2 Diagnosestellung

Es gibt viele verschiedene Untersuchungsmethoden, die letztlich zur Diagnose eines Pemphigus verhelfen. Bereits die klinische Untersuchung gibt einen ersten Hinweis. Beim Pemphigus ist das Nikolski-Phänomen charakteristisch. Hierbei löst sich die Epidermis durch lateralen Fingerdruck [140]. Nicht nur die Klinik und einfache klinische Untersuchungsmethoden – wie beispielsweise das Nikolski-Zeichen oder der Tzank-Test – verhelfen zur Diagnose, vielmehr steht heute die labormedizinische Diagnostik mit immunologischen Methoden zur exakten Diagnostik im Vordergrund.

In der histologischen Untersuchung (siehe Abbildung 8, Seite 20) zeigt sich oft eine intraepidermale Akantholyse mit suprabasaler Lokalisation des Spalts, wobei die desmosomalen Verbindungen der Keratinozyten verloren gegangen sind [165]. Die basalen Keratinozyten verbleiben hierbei auf der Basalmembran.

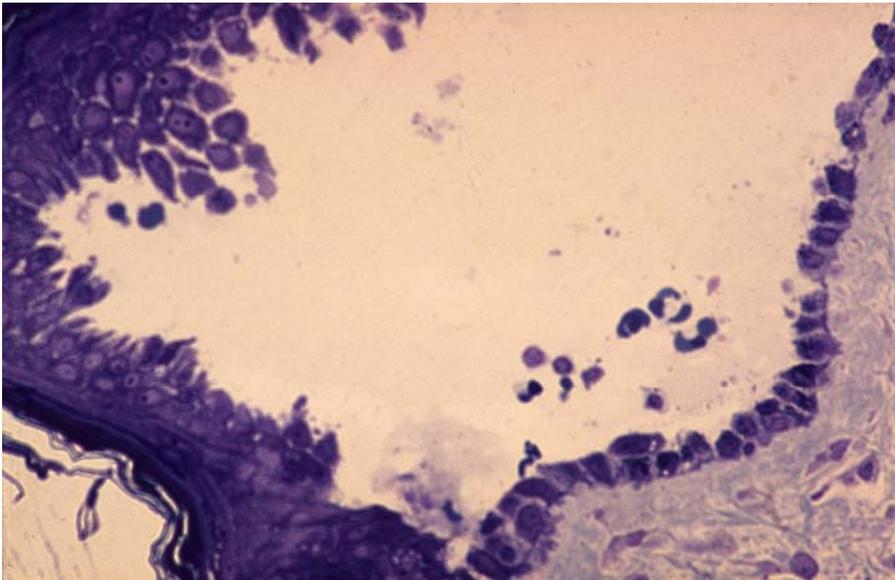


Abbildung 8: Intraepidermaler Spalt bei PV im histologischen Präparat mit den „Tombstone“-Zellen als Muster an der BMZ (rechts).

In der direkten Immunfluoreszenzuntersuchung lassen sich auf der Zelloberfläche der epidermalen Zellen netzförmige IgG-Ablagerungen nachweisen, die in ca. 50% der Fälle ebenfalls für die Komplementkomponente C3 gefunden werden [260]. Im Serum der Patienten konnten Beutner und Jordon in über 90% der Fälle zirkulierende IgG-Auto-Antikörper nachweisen [31]. Diese gehören in erster Linie zur Klasse IgG4 und selten zu IgG1, IgG2 oder IgG3 [255]. In der indirekten Immunfluoreszenzuntersuchung lassen sich im Blut von PV-Patienten zirkulierende Auto-Antikörper gegen Desmosomen nachweisen [165].

gewiesen werden [164]. In Studien von Harman et al. und Amagai et al. wurden zwei ELISA-Tests für Dsg1 beziehungsweise Dsg3, mit denen sich IgG-Auto-Antikörper nachweisen lassen, auf ihre Spezifität und Sensitivität untersucht. Hierbei wurden rekombinante Dsg1- und Dsg3-Substanzen entwickelt, die von einem Baculovirus exprimiert wurden. Es ergab sich, dass beide Testverfahren objektiv, sensitiv (Sensitivität > 97%) und spezifisch (Spezifität > 97%) sind. Sie können zur Differenzierung zwischen Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus, als zweithäufigstem Vertreter aus der Pemphigus-Gruppe, dienen. Klinisch ist eine Unterscheidung nicht immer möglich, da sowohl der Entstehungsmechanismus als auch das klinische Bild dem des PV sehr ähnlich sein kann.

Die Unterscheidung zwischen den beiden Erkrankungen ergibt sich aus den krankheitsspezifisch unterschiedlichen Aktivitäten gegen Dsg1 und Dsg3. Bei Positivität gegen Dsg3 muss unabhängig von der Positivität gegen Dsg1 ein PV vorliegen. Ist das Serum dagegen negativ gegen Dsg3 und positiv gegen Dsg1, so ist die Diagnose PF gesichert (siehe Tabelle 3, Seite 22).

	Dsg1	Dsg3
Pemphigus vulgaris	positiv oder negativ	positiv
Pemphigus foliaceus	positiv	negativ

Tabelle 3: Serologische Kriterien zur Differenzierung zwischen Pemphigus vulgaris (PV) und Pemphigus foliaceus (PF). Unterschieden wird durch das Vorliegen von Desmoglein 1 (Dsg1) beziehungsweise Dsg3.

Darüberhinaus bietet das ELISA-Verfahren eine gute Möglichkeit, die Krankheitsaktivität zu bestimmen, da die Reaktivität der Auto-Antikörper gegen die Desmogleine mit der Krankheitsschwere assoziiert ist [15, 107].

In einer Studie von 2006 zeigte ein ELISA-Test zum Nachweis von Dsg1 und Dsg3 im Speichel eine signifikante Korrelation zum Serumtiternachweis [21]. Hier hat sich möglicherweise eine ganz neue, „unblutige“ Untersuchungsoption ergeben.

1.1.2.3 Epidemiologie

Es gibt in der Literatur Hinweise, dass die Pemphiguserkrankungen mit einer Inzidenz von 1 bis 5 jährlichen Neuerkrankungen pro eine Million Einwohner auftreten. Etwa die fünf-fache Anzahl von Menschen erkranken jährlich neu am bullösen Pemphigoid [25, 30, 157, 235, 297].

Wie auch beim BP scheinen ethnische und somit genetische Unterschiede Einfluss auf die PV-Entstehung zu haben. Die PV-Erkrankung kommt bei allen Rassen und ethnischen Gruppen vor, doch sie ist bei Menschen jüdischen und mediterranen Ursprungs am häufigsten [105, 157, 257].

In Finnland wird die Inzidenz mit 0.76 [122], in Frankreich mit 1.7 [25] bis hin zu 4.2 in Connecticut [257] und 32 neuen Fällen pro eine Million Einwohner pro Jahr in der jüdischen Bevölkerung angegeben [157, 257]. Ebenso findet sich im Vergleich zu Deutschen bei italienischen und türkischen Menschen eine bis zu 9-fach erhöhte Inzidenz [105, 235]. Tallab et al. haben bei PV-Patienten aus Saudi-Arabien eine Inzidenz von 15.6 Neuerkrankungen pro eine Million Einwohner in der Gesamtbevölkerung nachgewiesen. Wenn man hier die Inzidenz für die Personen über 20 Jahre berechnet, ergibt sich sogar eine Inzidenz von 27 pro eine Million Einwohner. Der Altersgipfel liegt bei 43.1 ± 13.4 Jahren. Das Verhältnis männlich zu weiblich liegt bei den saudi-arabischen Patienten bei 2.2 : 1 [267].

Am PV kann man prinzipiell in jedem Lebensalter erkranken, allerdings sind Kinder und Personen über 75 Jahre nur selten betroffen [140]. Eine PV-Häufung wird nur zwischen der vierten und sechsten Lebensdekade angegeben [42].

1.1.2.4 Therapie

Nach Studien von Carson et al. verliefen Erkrankungen wie PV in der „Prä-Kortison-Ära“ (1942 - 1962) zumeist letal (71%). Mit Einführung der Glukokortikoidtherapie konnte im Zeitraum von 1962 - 1982 die Letalität auf 21% gesenkt werden [56]. Es gibt sogar Untersuchungen, die von einer Sterblichkeit von bis zu 90% vor der Kortison-Ära sprechen [65].

Auch beim PV sind Glukokortikoide Mittel der Wahl. Allerdings kann heute durch eine sinnvolle adjuvante Therapie mit zum Beispiel Dapson [111], Azathioprin, Cyclophosphamid, Methotrexat oder Goldpräparaten [56] und auch Chloroquin [53, 78] die Glukokortikoiddosis gesenkt werden.

Die lokale Glukokortikoidtherapie durch Externa kommt zusätzlich zur Anwendung.

Eine neue Stufe der Therapie wird durch die Beeinflussung der spezifischen IgG-Spiegel erzielt. Neben Myasthenia gravis und Dermatomyositis findet auch beim PV die intravenöse Gabe hochdosierter Immunglobuline (IvIg) Anwendung. Beim PV werden einmal im Monat lösliche IgG-Präparate und zwischen den Intervallen niedrigdosierte Glukokortikoide gegeben [26, 189, 265]. Es gibt Untersuchungen, die postulieren, dass die IvIg-Therapie zu einem signifikanten Rückgang der Auto-Antikörpertiter führt [52, 121, 236]. Auch Ri-

tuximab in Kombination mit IvIg-Gabe wird einer Studie von 2006 zufolge ein positiver Effekt bei PV-Erkrankung zugeschrieben [8].

Mit Plasmapherese, die mit Blutzellseparatoren unter Verwendung von Doppelfiltern durchgeführt wird, gelingt es, die pathogenen Auto-Antikörper aus dem Serum zu extrahieren. [53]. Dieses Verfahren ist zwar sehr kostenintensiv, aber bei richtigem Vorgehen sehr risikoarm. Da in einer Studie von 2004 beschrieben wird, dass eine bestehende Schwangerschaft eine PV-Erkrankung auslösen kann, erscheint gerade hier eine nebenwirkungsarme Therapieform wie Plasmapherese oder IvIg essentiell [254].

Allerdings gibt es kontroverse Hinweise, ob man mit Plasmapherese bei Erkrankungen der Pemphigusgruppe nennenswerte Erfolge erzielen kann [53, 96, 106, 125]. In einer Studie von Mazzi et al. aus dem Jahre 2003 wird berichtet, dass bei PV sowie bei BP durch die Anwendung von Plasmapherese eine Reduzierung der Dosis der systemischen Glukokortikoide um durchschnittlich 70% erreicht werden kann [180].

Eine neue Behandlungsmöglichkeit hat sich in der Methode der Protein A-Immunadsorption ergeben. Hierdurch lassen sich aus dem Blutkreislauf effektiv Auto-Antikörper entfernen. Der Vorteil dieser Therapie besteht darin, dass große Plasmavolumina behandelt werden können, ohne dass eine Plasmasubstitution nötig wäre [247].

Es gibt Hinweise aus dem Jahre 2003, die eine Therapie mit Anti-Interferon- γ -Antikörpern bei Th1-abhängigen Autoimmunerkrankungen wie PV in Aussicht stellen [258].

Alternativ kann beim PV auch die Pulstherapie Erfolge bringen. Hierbei wird einmalig oder kurzzeitig ein hochdosierter i.v.-Bolus von Immunsuppressiva (Glukokortikoide 10 - 20 mg/kg KG über drei Tage oder Cyclophosphamid 500 - 1500 mg über einen oder drei Tage oder eine Kombination aus beiden Wirkstoffen) gegeben und die Applikation in mehrwöchigem Abstand mehrmals wiederholt. Zwischen den Zyklen werden per os in niedriger Dosierung Glukokortikoide oder Cyclophosphamid gegeben. Vorteile dieser Therapieform ergeben sich durch das schnelle Ansprechen, das zu schneller Blasenabheilung führt und somit den Krankenhausaufenthalt verkürzt [228, 189].

Die immunablative Hochdosis-Cyclophosphamid-Therapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation wird bei sehr schweren, progredienten Autoimmunerkrankungen mit potentiell letalem Verlauf diskutiert [45].

Goldpräparate haben als Monotherapie zu geringe Wirksamkeit und müssen in Kombination mit niedrigdosierten Glukokortikoiden verabreicht werden. Nachteilig ist hierbei allerdings eine hohe Rate an unerwünschten Nebenwirkungen (Stomatitis, Gingivitis, Ul-

zationen) und der späte Wirkungseintritt. Somit ist Gold für die Akutbehandlung ungünstig und wurde verlassen [189].

PV ist eine lebensgefährdende Erkrankung, die ohne Therapie sehr oft tödlich endet [165]. Die mittlere Überlebenszeit betrug vor Einführung der Glukokortikoide 15 Monate. Haupttodesursachen sind Flüssigkeitsverluste wie nach Verbrenungen und Mangelernährung bei schwerer Mundschleimhautbeteiligung [42].

Die Letalität ist abhängig von der Schwere der Erkrankung. So konnten Carson et al. mit signifikantem Ergebnis nachweisen, dass bei leichterer Form das Mortalitätsrisiko geringer ist [56]. Hierzu zählen beispielsweise auch Patienten, deren PV-Erkrankung bei Therapiebeginn nur auf die Schleimhäute beschränkt war [195].

Aber selbst die Nebenwirkungen der Medikamente nehmen Einfluss auf die Prognose. So erhöhen hohe Glukokortikoiddosen, die zur Remission im akuten Stadium notwendig sind, letztendlich wegen ihrer Nebeneffekte die Letalität. Die verstärkte Infektanfälligkeit durch die Immunsuppressiva kann zu Komplikationen und schweren zusätzlichen Erkrankungen führen [195].

Eine ernste Komplikation, die rechtzeitig erkannt und behandelt werden sollte, ist die Dysphagie. Diese tritt als Folge von Schleimhautläsionen in Mund und weiterführender Speiseröhre auf. Die Konsequenzen sind verminderte oder unmögliche Nahrungsaufnahme, die für den Patienten unter Umständen lebensbedrohlich werden kann. Hierbei ist mit gefährlicher Mangelernährung, Elektrolyt- und Albuminverlusten zu rechnen. Aus diesen Gründen wird auch eine frühzeitige obere Intestinoskopie empfohlen, um einen Speiseröhrenbefall rechtzeitig erkennen und behandeln zu können [86].

1.1.2.5 Pathogenese

Braun-Falco bezeichnet den PV als Prototyp einer Autoimmunerkrankung der Haut, da die pathogenen Antikörper direkt die pathogenetische Hauptrolle spielen. Anders als beim BP scheinen Komplementsystem und Entzündungsmediatoren einen nicht so großen Beitrag bei der Pathogenese des PV zu leisten. Sogar wenn das Komplementsystem und weitere Mediatoren blockiert werden, lässt sich mit PV-Auto-Antikörpern in vitro eine Akantholyse hervorrufen [41].

Pathophysiologisch betrachtet entsteht der suprabasale Spalt beim PV durch intraepidermale Auto-Antikörper, die sich gegen desmosomale Strukturproteine, die die Keratinozyten verbinden, richten. Erstmals gelang es Beutner und Jordan 1964 mittels indirekter Im-

munfluoreszenz, diese Auto-Antikörper im Serum von PV-Patienten nachzuweisen [31]. Eine andere Theorie besagt, dass die Blasen in der Epidermis beim PV möglicherweise auch durch die Zerstörung der Keratinozyten infolge zellulärer Immunaktivierung und anschließendem Absterben dieser Zellen – wahrscheinlich durch Apoptose – entstehen [239]. An der stabilen desmosomalen Zell-Zell-Verbindung (siehe

Abbildung 9, Seite 21) zwischen den Keratinozyten sind hauptsächlich Proteine der Gruppe der Cadherine beteiligt [159]. Die zwei Untergruppen der von den Keratinozyten gebildeten Cadherine werden als Desmogleine (Dsg1, Dsg2, Dsg3) und Desmocolline (Dsc1, Dsc2, Dsc3) bezeichnet [50]. Nachdem molekularbiologisch die Zugehörigkeit des PV-Antigens zur Gruppe der Cadherine beziehungsweise Desmogleine gezeigt werden konnte, wurde es als Dsg3 eingeordnet [50]. Die pathogenetisch relevanten Abschnitte des Dsg3 liegen auf den beiden membranfernen Amino-terminalen Regionen ECD1 (extracellular domain) und ECD2 [14]. Das PV-Antigen, das mittels Immunfluoreszenz, Immunpräzipitation und Westernblot nachgewiesen werden konnte, ist ein 130-kD-Glykoprotein, das mit Plakoglobin interagiert [51, 81]. Nach Studien von Jones und Bhol gehören die krankheitsverursachenden Auto-Antikörper beim PV überwiegend zu der IgG-Unterklasse 4 und auch IgG1 [32, 33, 138, 255] und richten sich in erster Linie gegen Dsg3 [85]. Den Klassen IgG2 und IgG3 zugehörige Auto-Antikörper lassen sich sehr selten finden [255]. Patienten, bei denen vorwiegend IgG1-Antikörper vorliegen, befinden sich zumeist in Remission, während Betroffene mit IgG4 akut erkrankt sind [32, 271].

Zur Akantholyse kommt es durch Proteasenaktivität (z.B. Plasminogenaktivator) nach Bindung der Antikörper an die Antigenbindungsstelle. Phospholipase C spielt eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung der transmembranen Signalkaskade, wenn IgG an den Rezeptor gebunden hat [80].

Die Schlüsselrolle kommt den autoreaktiven T-Lymphozyten in der Pathogenese des PV zu:

1. Die Antikörper-Produktion benötigt grundsätzlich die Hilfe der T-Lymphozyten.
2. Die Beteiligung von CD4⁺-T-Lymphozyten ist streng mit den verschiedenen HLA-Klasse-II-Allelen assoziiert.
3. Die T-Lymphozyten-Erkennung von Dsg3-Epitopen spielt eine große Rolle bei der Initiation und Durchführung der Produktion der Dsg3-spezifischen Auto-Antikörper durch die B-Zellen.
4. Die autoreaktiven CD4⁺-T-Lymphozyten bilden vorwiegend Th2-Zytokine [113].

Auch Auto-Antikörper gegen Dsg1 und Dsc wurden als Zielantigene im Serum von PV-Patienten gefunden. Allerdings ist deren Rolle bei der Pathogenese der Blasen bisher nicht geklärt [109].

Wie auch bei der Erkrankungsgruppe Pemphigoid, finden sich bei den Pemphigus-Erkrankungen unterschiedliche Antikörper-Antigen-Muster (siehe Tabelle 4, Seite 27).

Erkrankung	Autoantigen	Auto-Ak	Lokalisation
Pemphigus vulgaris	Dsg3 (Dsg1)	IgG1, IgG4	Desmosom
	Dsc	IgG	Desmosom
Pemphigus foliaceus	Dsg1	IgG1, IgG4	Desmosom
Paraneoplastischer Pemphigus	Dsg3 (Dsg1)	IgG	Desmosom
	Desmoplakin I, II	IgG (IgA)	Desmosom
IgA-Pemphigus	Dsg3, Dsc	IgA	Desmosom

Tabelle 4: Pathogenetische Besonderheiten bei den Erkrankungen der Pemphigusgruppe. Unterschieden wird nach Autoantigenen, Auto-Antikörpersubklassen und Lokalisation [113].

In einem „aktiven“ Krankheitsmodell gelang es Amagai et al. durch In-vitro-Produktion Dsg3-spezifischer Auto-Antikörper im Mausmodell die wichtige Rolle der T- und B-Lymphozyten bei der PV-Pathogenese zu unterstreichen. Die Arbeitsgruppe übertrug Dsg3-reaktive T- und B-Lymphozyten von Dsg3-defizienten Mäusen, die mit Dsg3 immunisiert wurden, auf immundefiziente Mäuse mit normaler Dsg3-Expression. Daraus resultierte eine In-vivo-Produktion von Dsg3-spezifischen Auto-Antikörpern, die entsprechend des Krankheitsbildes beim Menschen zu Erosionen an den Schleimhäuten der Mäuse führte [16].

In neueren Studien wurden zwei Acetylcholinrezeptoren als mögliche Autoantigene beim Pemphigus beschrieben: Pemphaxin, ein Anxin-Homolog, das Acetylcholin bindet und daneben auch der α_9 -Acetylcholinrezeptor [200]. Die Funktion dieser potentiellen Autoantigene im Pathogeneseweg ist aber noch unklar.

Wie beim BP entsteht die PV-Erkrankung meist spontan [158]. Es gibt jedoch auch beim PV Medikamente, die in Verdacht stehen, PV auslösen zu können. So sind nach der Gabe von Rifampicin [93] oder Chloroquin [90] PV-Erkrankungen beobachtet worden.

Auch nach Einnahme von Penicillamin oder Captopril sind Pemphiguserkrankungen aufgetreten. Als Ursache wird bei Penicillamin der immunmodulatorische Effekt vermutet, da es die Fähigkeit besitzt, Antigenstrukturen zu verändern [139]. Auch wurden nach Gabe von Piroxicam [177] oder Enalapril [286] PV-Erkrankungen beschrieben. Als krankheitsauslösend werden hier Sulfhydrylgruppen betrachtet. Diese interagieren mit Dsg1 oder Dsg3 und können zur Entstehung von Blasen führen. Klinisch entspricht das Krankheitsbild in der Regel dem Pemphigus foliaceus, selten finden sich auch Erosionen an der Mundschleimhaut wie beim PV. Selbst Lebensmittel wie z.B. Knoblauch tragen Sulfhydrylgruppen, die PV-Blasen entstehen lassen könnten [41, 233]. In einer Fallbeschreibung aus dem Jahre 2004 wird eine Bestrahlungstherapie als Auslöser für eine PV-Erkrankung angegeben. Die Blasen traten dabei genau im Bestrahlungsfeld des Mammacarcinoms auf [211].

In einer Publikation von 2006 wurde sogar zwischen dem Stich einer Honigbiene und der PV-Entstehung ein Zusammenhang vermutet [99].

1.1.2.6 Genetik

Bei Pemphiguspatienten wurden gehäuft die HLA-Haplotypen DR4, DR6, DQ5 und DQ8 gefunden, was eine genetische Prädisposition vermuten lässt [6, 9, 153]. Auch konnte eine Häufung der HLA-Allele A10 [160] und DRw4 [214] nachgewiesen werden. Ebenso war in einer Studie von Katz et al. eine erhöhte Frequenz von HLA-Typ A13 bei nicht-jüdischen und nicht-mediterranen Patienten signifikant erhöht [147]. Loiseau et al. und Lombardi et al. konnten eine Assoziation zwischen der Entstehung eines PV und den HLA-Klasse-II-Allelen DRB1*0402, 1401/04 und DQB1*0503 zeigen [172, 173]. Diese HLA-Klasse-II-Allele spielen eine Rolle bei der Dsg3-Antigenpräsentation gegenüber autoreaktiven T-Lymphozyten [115]. Auch bei klinisch gesunden Trägern dieser HLA-Konstellationen finden sich autoreaktive T-Lymphozyten [116].

Bei der PV-Antikörperbildung spielt eine erbliche Komponente eine große Rolle. So konnten in Studien mit einer Inzidenz zwischen 45% und 71% mittels IIF und Immunoblot PV-IgG-Antikörper in den Seren von erstgradig Verwandten erkrankter Personen gefunden werden, obwohl bei den Betreffenden keine Krankheitsanzeichen vorhanden waren. Als Ursache für die Auto-Antikörperbildung ist die genetische Prädisposition zu nennen, die sich in den individuellen HLA-Typ-Konstellationen niederschlägt [6, 40, 175]. Dass die untersuchten Personen trotz Auto-Antikörper nicht erkrankt waren, spricht dafür, dass auch die Pathogenese einen multifaktoriellen Charakter hat und nicht allein die genetischen

Voraussetzungen für die Krankheitsentstehung ausreichen. Ähnlich findet man bei Personen – oft zufällig – Auto-Antikörper, die typisch für beispielsweise den systemischen Lupus erythematoses oder für rheumatische Erkrankungen sind, obwohl sie nicht erkrankt sind. Diese Besonderheit sollte berücksichtigt werden, da sie zeigt, dass das oben beschriebene „Antikörper-Maus-Modell“ (Kapitel 1.2.2.5, Seite 31) von Amagai et al. [16] nicht zweifelsfrei auf den Menschen übertragen werden kann.

1.2 Immunologische und genetische Grundlagen

1.2.1 Immunologische Grundlagen

Ein wichtiges System zum Erhalt der Integrität des menschlichen Körpers ist das Immunsystem. Über 400 Millionen Jahre hat die Evolution benötigt, um den hochdifferenzierten und anpassungsfähigen Abwehrapparat in Form unseres Immunsystems zu entwickeln. Seine Aufgabe ist, den Körper vor infektiösen und neoplastischen Gefahren zu schützen.

Es gibt grundsätzlich zwei verschiedene Arten von Immunmechanismen, denen unterschiedliche Abwehrsysteme zur Verfügung stehen.

Einerseits wäre die unspezifische Immunabwehr zu nennen. Dabei werden keine individuellen Konformationen oder Proteinstrukturen abgewehrt, sondern es werden unabhängig vom Erreger unterschiedliche, nichtklonale Abwehrmechanismen in Gang gesetzt. Hierzu zählen neben dem Säuremantel der Haut und der intakten Epidermis antimikrobielle Enzymsysteme, unspezifische Mediatoren wie Interferone und verschiedene Interleukine, das Komplementsystem sowie das Monozyten-/Makrophagensystem, neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen.

Dem gegenüber steht das spezifische, humorale Immunsystem. Die wichtigsten Zellen sind bei dieser Form der Immunantwort die T- und B-Lymphozyten. T-Lymphozyten werden in unterschiedliche spezialisierte Subgruppen wie T-Helferzellen, T-Gedächtniszellen (*memory cells*), zytotoxische T-Zellen und regulatorische T-Zellen aufgeteilt. Mit Hilfe der CD (*Cluster of differentiation*) 4+-T-Helferzellen können beispielsweise nach Bindung an antigenpräsentierende Zellen B-Zellen aktiviert und darüber zur Proliferation und Synthese von Immunglobulinen (Ig) angeregt werden. Zusätzlich ist eine Bildung von spezifischen CD4-Gedächtnis-T-Zellen möglich, die bei wiederholtem Antigenkontakt eine schnelle und effektive systemische Immunantwort – die *Recall*-Antwort – liefern.

Die für diese Form der Immunantwort wesentlichen T-Lymphozyten werden im Thymus differenziert. Die T-Lymphozyten können Antigene nicht selbständig erkennen. Zur Antigenerkennung benötigen sie einen Partner, welcher das Antigen einem spezialisierten Oberflächenprotein, dem $\alpha\beta$ -T-Zellantigenrezeptor (TCR), in Form einer Peptidkette gegenüberstellt [251, 303]. Diese Eiweißkette wird den T-Lymphozyten durch Moleküle des *major histocompatibility complex* (MHC) präsentiert. Diese für die Präsentation wesentlichen Moleküle werden in zwei Gruppen unterschieden. Die humanen Leukozytenantigene (HLA) der Klasse I sind auf fast allen Körperzellen, die der Klasse II überwiegend auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (APC) vertreten. Die Region der HLA-Moleküle, die das Peptid binden, ist nach außen gerichtet, so dass gebundene Antigene mit dem T-Zellantigenrezeptor in Kontakt treten können. Eine wichtige Rolle für den weiteren Verlauf der daraufhin in Gang gesetzten Immunreaktion spielen Zytokine.

Diese bilden eine in ihren Funktionen vielgestaltige Familie von sezernierten, doch gelegentlich auch membrangebundenen Polypeptiden, welche alle Aspekte einer Immunantwort beeinflussen können. Zu den Zytokinen zählen Interleukine (IL), Interferone, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Tumornekrosefaktor und Kolonie-stimulierende Faktoren. Gebildet werden sie meist von Zellen des Immunsystems, können aber auch von Zellen außerhalb des Immunsystems bereitgestellt werden. Die Übermittlung von Signalen ist mit Hilfe von Zytokinen über sehr viel größere Entfernungen möglich als beim direkten Zell-Zell-Kontakt. Zytokine werden nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip über spezifische Rezeptormoleküle an die Oberfläche der Zielzellen gebunden. Durch Konformationsänderungen des Rezeptors wird eine Signalkaskade aktiviert und schließlich folgt eine Signalübertragung ins Zellinnere. Dabei kommt es über Genaktivierung und mRNA-Synthese zur Herstellung von wichtigen Proteinen der Immunantwort und Reaktionen der Zielzellen. Zytokine können beispielsweise proinflammatorische sowie proliferative und proliferationshemmende Effekte bedingen. Daneben können sie auch eine gezielte Migration und Diapedese von Immunzellen auslösen.

Noch vor 20 Jahren war die Untersuchung des komplexen Zytokinnetzwerkes noch sehr schwierig. Erst mit der Nutzung monoklonaler Antikörper und mittels Etablierung molekularbiologischer Methoden wie Reinigung, Isolierung, Charakterisierung und Klonierung der beteiligten Moleküle wurde eine Entschlüsselung möglich [191].

T-Helfer(Th)2-Lymphozyten und zytotoxische Th1-Lymphozyten unterscheiden sich durch ein unterschiedliches Profil der Zytokinsekretion. Mosmann et al. ist es zuerst gelungen, nach Aktivierung von CD4⁺-T-Lymphozytenklonen der Maus zwei verschiedene

Sekretionsprofile nachzuweisen [194]. Diese beiden unterschiedlichen T-Helferzell-Typen entwickeln sich je nach Antigenverarbeitung durch die unspezifischen Abwehrzellen aus Th0-Zellen. Die Th1-Zellen sezernieren vor allem Interleukin(IL)-2, IL-12, Interferon(IFN)- γ und den Tumornekrosefaktor(TNF)- β [40, 224]. Diese Zytokine sind über die Aktivierung von Makrophagen für ausgeprägte Entzündungsreaktionen verantwortlich, die auch das Abtöten von intrazellulären Erregern ermöglichen [40]. Dagegen sind die Th2-Zellen für die Produktion von IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13 und IL-14 verantwortlich und aktivieren B-Zellen zur Produktion von Antikörpern [40, 224].

Bestimmte Erkrankungen – beispielsweise kontaktallergische Reaktionen und Erkrankungen des atopischen Formenkreises – werden mit einer Fehlsteuerung über Th2-Zellen in Verbindung gebracht. Hierbei sind die wesentlichen Interleukine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 [224]. Auch Kay et al. und Tanka et al. konnten zeigen, dass bei Erkrankungen, die dem atopischen Formenkreis angehören, oder auch bei anderen allergischen Reaktionen, einschließlich dem verzögerten Spättyp, in der Haut in erster Linie Th2-Zytokine exprimiert werden [150, 268].

1.2.1.1 Immunologie der Autoimmunerkrankungen

Das komplexe Zusammenspiel von T- und B-Lymphozyten als Initiatoren und Antikörperproduzenten ist für die spezifische Immunantwort unseres Körpers auf „fremde“ beziehungsweise pathogene Stoffe wesentlich. Dabei ist es von großer Bedeutung, dass es dem Körper zuverlässig gelingt, zwischen „körperfremden“ und „körpereigenen“ Stoffen zu differenzieren. Das Immunsystem muss autotolerant gegen körpereigene Proteine und unschädlichen Proteinen wie Nahrungsmittel sein. Kommt es zum Verlust der Autotoleranz, so können Autoimmunerkrankungen entstehen, bei denen der Körper eine Immunantwort gegen „körpereigene“ Proteine bildet [167]. Bisher ist die Mitwirkung der T-Lymphozyten bei Autoimmunerkrankungen wie multipler Sklerose [13], Myasthenia gravis [183] und der Basedow-Erkrankung [196] nachgewiesen. Krankheitsspezifische T-Lymphozyten tolerieren hierbei „körpereigene“ Antigene nicht, sondern tragen durch Initiation einer Immunantwort zur Produktion von Antikörpern gegen eigene Zellen bei. Für die Bildung dieser Auto-Antikörper sind die B-Zellen verantwortlich [62, 94, 113].

1.2.1.2 Immunologie der bullösen Dermatosen

CD4+-Typ2-T-Helferzellen scheinen gehäuft in den entzündlichen Infiltraten der Haut und im Blut von BP- und PV-Patienten vorkommen [117, 190]. Unter immunsuppressiver The-

rapie konnte sogar ein Rückgang der T-Helferzellen zu normaler Anzahl verzeichnet werden. Dies lässt vermuten, dass die Aktivierung der T-Helferzellen mit der akuten Phase dieser Erkrankungen in Verbindung steht [240].

Bei den bullösen Dermatosen BP und PV handelt es sich um Autoimmunreaktionen mit T- und B-Zellaktivierung und Auto-Antikörperbildung. Das Immunsystem toleriert hierbei die körpereigenen Proteinstrukturen der Zell-Zell-Verbindungselemente nicht, sondern löst eine Immunantwort aus. Dabei werden die Autoantigene autoreaktiven T-Lymphozyten präsentiert, die daraufhin über Zytokinfreisetzung B-Zellen zur Antikörperbildung anregen.

Die besondere Zytokinzusammensetzung, die in verstärktem Maße in den Blasenflüssigkeiten und Seren dieser Patienten gefunden werden kann, legt nahe, dass bei diesen Autoimmundermatosen gerade die Th2-Aktivierung eine wesentliche Rolle spielt. Es ist außergewöhnlich, dass eine Autoimmunerkrankung vorwiegend durch die Th2-Antwort vermittelt wird. Bei den meisten Autoimmunerkrankungen, wie z. B. rheumatoider Arthritis, Lupus erythematoses, multipler Sklerose, Myasthenia gravis und Morbus Bechterew oder der Psoriasis leisten entweder nur Th1-Zellen und deren Zytokine oder ein Gemisch von Th1- und Th2-Zytokinen den pathogenetischen Beitrag [226, 262, 287, 295]. Eming et al. ist es im Jahr 2000 gelungen, die autoreaktiven T-Lymphozyten mittels ELISPOT (enzyme-linked immunospot) qualitativ und quantitativ bei BP und PV nachzuweisen [76].

1.2.1.2.1 BP

Mutmaßlich spielen bei der Entstehung des BP die Th2-Zellen eine wesentliche Rolle. In Biopsien von Hautläsionen und dem umgebenden Hautgewebe konnten mittels immunohistochemischer Methoden hauptsächlich IL-4 [224], IL-5 [77, 224], IL-13 [224] und nur geringer IL-2 und IFN- γ nachgewiesen werden [224]. Es wurde in mehreren Studien gezeigt, dass die Zellen, die für die IL-4- und IL-5-Produktion beim BP verantwortlich sind, in der Dermis lokalisiert sind [266, 268, 291]. Rico et al. konnten außerdem IL-4- und IL-13-mRNA in dermalen mononukleären Entzündungszellen der Blasen und eine gesteigerte Expression des *Vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1 im Endothel nachweisen [224]. Dies und auch die starke Präsenz von Eosinophilen EG2+ in BP-Läsionen und im Blut der Patienten [49] deuten auf einen Zusammenhang mit Th2-Zellaktivierung hin.

In der Studie von Rico et al. wurden die Hautbiopsien sehr früh nach Erkrankungsbeginn entnommen. Es ist also nicht ausgeschlossen, dass sich die Zytokinexpression im Laufe der Erkrankung ändert, sowie auch die Konstellation der Zytokinspiegel während der Krankheitsentwicklung.

Michalaki et al. konnten zeigen, dass im entzündlichen Infiltrat beim BP eine sehr große Zahl von mononukleären Zellen vorhanden ist. Ebenfalls konnten sie in allen untersuchten Biopsien T-Zellen (CD3+, CD45RO+) und aktivierte T-Helferzellen (CD4+, CD25+) finden. T-Zellen waren sowohl am Blasengrund als auch in der dermoepidermalen Grenzzone in engem Kontakt mit der Basalmembranzone in prä- und peribullöser läsionaler Haut nachweisbar. Michalaki et al. zeigten, dass aktivierte T-Zellen in der Frühphase eines BP gefunden werden können. Dieses Ergebnis legt nahe, dass den T-Zellen bzw. T-Helferzellen durch Auto-Antikörperbildung eine entscheidene Rolle bei der Pathogenese zukommt [190].

Über TNF- α liegen bereits Ergebnisse vor, die zeigen, dass dieses Zytokin einen Beitrag bei der Entstehung leistet. Tumornekrosefaktor (TNF)- α ist ein potentes T-zellulär vermitteltes Zytokin, das B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen kann [39]. Zillikens et al. und Zentner et al. gelang der Nachweis hoher TNF- α - und TNF-Rezeptor-Spiegel in der Blasenflüssigkeit von BP-Läsionen [294, 301].

BP ist eine Autoimmunerkrankung, die durch Th2-Zellen induziert wird:

1. Hauptsächlich liegen beim BP Th2-regulierte Auto-Antikörper der Klasse IgG4 vor.
2. Das inflammatorische Infiltrat in den BP-Läsionen beinhaltet viele eosinophile Granulozyten.
3. BP ist oft mit hohem Serum-IgE-Spiegel assoziiert.
4. BP180-reaktive Th2-Lymphozyten können nur bei BP-Patienten gefunden werden, aber nicht bei gesunden Trägern des BP-assoziierten HLA-DQ β 1*0301-Typs, die für periphere T-Zell-Antworten verantwortlich sind [113].

1.2.1.2.2 PV

Die eindeutig krankheitsauslösende Wirkung von Auto-Antikörpern gegen Dsg3 unterstreicht die Rolle der B-Zellen bei der Pathogenese des PV. In einem Antikörper-Maus-Modell von Anhalt et al. konnte 1982 erstmalig gezeigt werden, dass die Injektion von gereinigtem IgG aus humanen Pemphigusseren bei neugeborenen Mäusen zur Ausbildung von Blasen an der Haut wie beim Pemphigus führt [22]. Allerdings ist zu vermuten, dass autoreaktive T-Zellen eine Bedeutung bei der Entstehung des PV haben. Hierzu geben experimentelle Studien die ersten Hinweise. So lag in einer Untersuchung von Hertl et al. das Augenmerk auf der Dsg3-spezifischen T-Zell-Antwort, der bei der Pathogenese des PV eine wichtige Rolle zukommt [115]. In Studien von Lin et al. und Hertl et al. konnte ge-

zeigt werden, dass bei PV-Patienten die T-Lymphozyten durch Kontakt mit einem von drei verschiedenen immunoreaktiven Segmenten des Dsg3-Peptids zur Proliferation gebracht werden. Diese Dsg3-Antworten sind assoziiert mit den MHC-Komplex HLA-DR11 [114] und HLA-DR1*0402 beziehungsweise *1401 [167].

In den Hautbiopsien von PV-Patienten ist ein Zytokingemisch vorhanden, das sowohl typische Th1- als auch Th2-Zytokine beinhaltet [225]. Die wichtigsten Vertreter sind IL-2 und IFN- γ als Th1-Zytokine und als Th2-Zytokin IL-4. Aber auch hier wurden die Biopsien im frühen Krankheitsstadium entnommen, so dass eine Änderung im weiteren Krankheitsverlauf nicht ausgeschlossen werden kann [224]. Die Präsenz von Zytokinen beider T-Helfer-Zelltypen entspricht Studien, in denen Dsg3-spezifische Zelllinien, die von peripheren Blutlymphozyten von PV-Patienten gewonnen wurden, sowohl Th1- als auch Th2-Botenstoffe (IL-4, IL-10 und IFN- γ) exprimierten [115, 167, 288].

1.2.1.3 Das Zytokin IL-4 und der IL-4-Rezeptor

1.2.1.3.1 Funktion des IL-4 und des IL-4-Rezeptors

Das Th2-Zytokin IL-4 scheint sowohl beim BP als auch beim PV eine wichtige Rolle zu spielen. Interleukin-4 ist ein pleiotropes und multifunktionelles Zytokin, das überwiegend von Th2-Zellen und in sehr geringem Maße von Mastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten produziert wird [57, 75, 199]. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der B- und T-Zell-vermittelten Immunantwort [218, 219]. IL-4 ist ein Wachstumsfaktor für präaktivierte B- und T-Zellen. Es hat große Bedeutung für die Th2-Zell-Entwicklung, indem es die Differenzierung dieser Zellen stimuliert und die der IFN- γ -produzierenden CD4+-T-Zellen unterdrückt [126, 252]. IL-4 aktiviert die IgG1- und IgE-Produktion, erhöht auf der Zelloberfläche der B-Zellen die Expression von CD23 beziehungsweise der Moleküle des MHC der Klasse II [58] und ist für eine Hochregulation der Oberflächenexpression des IL-4-Rezeptorkomplexes verantwortlich [69, 204, 207]. Gleichzeitig steuert es die Infiltration durch eosinophile Granulozyten [59]. IL-4 ist auch für die Änderung der Immunglobulinklassen (*class-switching*) zu IgE und IgG4 verantwortlich, was insbesondere bei Autoimmunerkrankungen von großer Bedeutung ist [61, 88, 278].

Die Wirkungen von IL-4 sind sehr vielfältig. So konnte nachgewiesen werden, dass IL-4 die Fähigkeit besitzt, das Wachstum und die Differenzierung von Mastzellen zu hemmen und gleichzeitig deren Apoptose zu induzieren [202, 212, 289].

Die Funktionen von IL-4 ergeben sich durch Bindung an den IL-4-Rezeptor der Zielzellen [193]. Die Signalkaskade, die IL-4 am Rezeptor auslöst, wird über drei verschiedene Kinasen der Janusfamilie (Jak-1, Jak-2, Jak-3) mittels Tyrosin-Phosphorylierung vermittelt. Hierbei wird an der α -Kette des IL-4-Rezeptors nur Jak-1 und bei manchen Zelllinien auch Jak-3 aktiviert [161, 290].

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass der IL-4-Rezeptor (IL-4R) vermehrt von soliden Tumoren sezerniert wird [217, 272, 277, 292]. Diese erhöhte Sekretion konnte beispielsweise beim malignen Melanom, Mammakarzinom, Ovarialkarzinom, bei Gehirntumoren und dem AIDS-assoziierten Kaposi-Sarkom nachgewiesen werden [127, 149, 205]. Mutmaßlich spielt dies eine wichtige Rolle beim gehäuften gleichzeitigen Auftreten einer BP-Erkrankung und eines malignen Tumor [234].

1.2.1.3.2 Aufbau und Lokalisation des IL-4-Rezeptors

Der IL-4-Rezeptor ist ein komplexer Transmembranrezeptor. Er besteht aus 825 Aminosäuren und ist ein Heterodimer aus einer 140 kDa schweren α - und einer γ -Kette [131, 285]. Beide Ketten gehören zur Familie der Hämatoetinrezeptoren [64]. An die γ -Kette können mehrere verschiedene Interleukine binden [131], dagegen ist die α -Kette spezifisch für IL-4 [206, 214, 290].

Die IL-4-Rezeptoren finden sich sowohl auf hämatopoetischen Zellen als auch auf Zellen, die nicht zum Blutsystem gehören, wie Epithel-, Endothel-, Muskel- und Leberzellen sowie Fibroblasten [174, 206].

1.2.2 Genetische Grundlagen

1.2.2.1 Genkodierung und genetische Lokalisation des IL-4-Rezeptors

Das Gen, das den IL-4 Rezeptor kodiert, wurde 1990 von der Arbeitsgruppe um Idzerda [131] identifiziert. Die Bestimmung der Lokalisation auf Chromosom 16p11.2 - 16p12.1 gelang Pritchard et al. ein Jahr später [223].

Der kodierende Genabschnitt für die α -Kette, mit der sich die vorliegende Studie befasst, umfasst 51 kb und beinhaltet 12 Exons. Das membrangebundene Protein dieser Kette setzt sich aus mehreren Anteilen zusammen und ist auf unterschiedlichen Genstücken kodiert. Das Signalpeptid liegt auf Exon 3, die extrazelluläre Domäne auf Exon 3 bis 7. Die

Transmembranzone findet sich auf Exon 9 und der intrazelluläre Anteil ist auf Exon 10 bis 12 lokalisiert [161].

1.2.2.2 Affinitätsänderungen als Ursache veränderter Funktion

Veränderungen der Rezeptorstruktur können eine veränderte Affinität des IL-4 zum IL-4-Rezeptor und damit eine verstärkte oder verminderte Wirkung verursachen. In diesem Zusammenhang liegt das Hauptaugenmerk auf Veränderungen auf genetischer Ebene. Hierbei können kleine Änderungen im Genmaterial weitreichende Folgen bedingen. Solche kleinen Mutationen werden als Polymorphismen bezeichnet.

1.2.2.3 Definition eines Polymorphismus

Der Begriff Polymorphismus wird definiert als eine Variation in der DNA-Sequenz, die durchschnittlich pro 100 Kopien einmal auftritt. Bei genetischen Polymorphismen gibt es für ein Gen mehrere Zustandsformen (Allele). Daly et al. gehen davon aus, dass im menschlichen Genmaterial im Durchschnitt alle 500 bis 1000 Basenpaare (bp) ein Polymorphismus auftritt [68].

Im *Single nucleotide polymorphism* (SNP) ist nur eine einzige Base, das heißt ein einziges Nukleotid ausgetauscht [68]. Als Erklärung für einen SNP soll folgendes Beispiel dienen: Ist in der Basenabfolge „Cytosin Adenin Adenin“ („C A A“) das erste Adenin (A) mit einem Guanin (G) vertauscht, so ergibt sich „C G A“. Drei Nukleotide ergeben jeweils den Gencode für eine Aminosäure, aus deren Zusammensetzung beziehungsweise Übersetzung („Translation“) letztlich das Protein gebildet wird. In diesem Beispiel ist die Variation „C A A“ der Code für die Aminosäure Glutamin, „C G A“ dagegen für Arginin. Diese Veränderung bedingt also den Einbau von Arginin statt Glutamin in die Aminosäurekette, die sich dann in ihrer Wirkung und Funktion vom „normalen“ Proteinaufbau des Wildtyps unterscheiden kann.

Vom *Human Genome Project* wurde eine SNP-Kartei veröffentlicht, in der mittlerweile 200 000 - 300 000 bekannte SNPs der menschlichen DNA erfasst sind [229].

An dieser Stelle scheint es sinnvoll darauf hinzuweisen, dass Polymorphismen in der Literatur sehr unterschiedlich bezeichnet werden. Manchmal findet sich beispielsweise folgende Variante: Gln576Arg. Das bedeutet, dass statt dem wildtypischen Glutamin Arginin in die Proteinkette an Position 576 eingebaut wird. Derselbe Polymorphismus wird aber auch mit Q576R beschrieben. Hierbei bezeichnet das „Q“ die wildtypische Allelform und „R“ die polymorph veränderte an der Position 576. Manchmal findet sich auch nur „R576“, um

die veränderte Variante zu beschreiben. Wichtig ist es auch zu wissen, dass unterschiedliche Positionsangaben gemacht werden. Das hängt davon ab, ob beispielsweise Signalpeptide mitgezählt werden. Hierbei wäre also „Gln576Arg“ (mit Signalpeptid) identisch mit „Gln551Arg“ (ohne Signalpeptid) [11].

1.2.2.4 Assoziationen von Polymorphismen mit Erkrankungen

Es wurden bereits in zahlreichen Studien Zusammenhänge zwischen bestimmten Polymorphismen und verschiedensten Erkrankungen nachgewiesen.

In dieser Hinsicht konnte in der Vergangenheit bereits in mehreren Untersuchungen gezeigt werden, dass polymorphe Varianten von TNF α , IL-10, *Transforming growth factor β 1* und IFN- γ wichtige Effekte in der Immunreaktion haben. Es gibt Hinweise, dass Verbindungen zwischen Polymorphismen und akuter Abstoßung von Nieren-, Lungen- oder Herztransplantaten bestehen [128, 129, 130].

In verschiedenen experimentellen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines Polymorphismus in Position -308 bp in der TNF- α -Promotor/Enhancer-Region beziehungsweise einer Veränderung im ersten Intron des Gens für TNF- β /Lymphotoxin (LT) - α und HLA-A1, -B8, -DR3 und hoher Zytokinproduktion von TNF- α und LT- α [186, 283, 284] nachgewiesen werden. Diese Zytokine können Apoptose initiieren [97]. Es wird vermutet, dass Veränderungen in den Genen, die TNF-Proteine kodieren, mit Autoimmunerkrankungen assoziiert sein könnten. Zusätzlich scheint hierbei ein Zusammenhang mit verstärkten Entzündungsreaktionen vorzuliegen [54, 181, 276].

Im Jahre 2002 haben Inoue et al. einen Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus im IL-4-Promotor-Gen an der Position -589, der mit gesteigerter IL-4-Produktion einhergeht, und der subakuten sklerotischen Panenzephalitis (SSPE) gefunden. Wenn zusätzlich zu diesem ein Polymorphismus im Gen für den Interferon (IFN)- γ -Rezeptor 2 besteht, ist eine Assoziation sogar noch häufiger zu beobachten [133].

Diese Beispiele zeigen deutlich, dass Zusammenhänge zwischen genetischen Polymorphismen und diversen Erkrankungen vielfältig sind.

In der vorliegenden Studie habe ich mich auf einen Polymorphismus am IL-4-Rezeptor konzentriert, da IL-4 bei der Pathogenese der bullösen Dermatosen – wie bereits erläutert – eine große Rolle spielt.

1.2.2.5 Assoziationen von IL-4-R-Polymorphismen und Erkrankungen

Bisher sind 13 verschiedene Polymorphismen am IL4-R-Gen bekannt [70, 112, 256].

Der IL-4 Rezeptor und seine Polymorphismen wurden und werden immer wieder in Zusammenhang mit Erkrankungen des atopischen Formenkreises [102, 285], Th2-vermittelten entzündlichen Erkrankungen [203, 210], systemischem Lupus erythematodes [146, 293] und Abstoßungsreaktionen nach Transplantation [103] untersucht.

So konnte beispielsweise von Rosa-Rosa et al., Hershey et al. und Hackstein et al. eine signifikante Assoziation von Atopie mit IL-4-Rezeptorpolymorphismen wie z. B. R576 [112, 227], A375 [102], R406 [103] und P478 [102] gezeigt werden.

Auch wurde 2003 eine Assoziation von allergischem Asthma mit dem Vorliegen des R576-Polymorphismus bei chinesischen Patienten nachgewiesen [66]. Gleiches gelang 2003 der Arbeitsgruppe um Beghe für englische Patienten [28].

Allerdings konnte man beispielsweise in einer Studie, in der man nachprüfen wollte, ob ein Zusammenhang zwischen Morbus Crohn beziehungsweise Colitis ulcerosa und vier Polymorphismen im IL-4-Rezeptor-Gen (Val150Ile, Gln576Arg, A3044G, G3289A) besteht, keine Assoziation nachweisen [210]. Auch ergab sich in einer Untersuchung aus dem Jahre 2003 kein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Schizophrenie und dem R576-IL-4-Rezeptorpolymorphismus [143].

1.2.2.6 Der IL-4-Rezeptor-Polymorphismus Gln576Arg

Beim IL-4 Rezeptor-Polymorphismus an der Position 576 ist in Nukleotidposition 1902 statt Adenin Guanin in den DNA-Strang integriert. Diese Codeänderung bewirkt, dass an der Position 576 (Q576R) statt Glutamin Arginin in der zytoplasmatischen Domäne des IL-4-Rezeptorproteins eingebaut ist. Die Veränderung steht im Verdacht, eine allergische Disposition zu bedingen, da bereits in mehreren Studien eine Assoziation zum atopischen Formenkreis nachgewiesen werden konnte [102, 285]. Hackstein et al. fanden eine Assoziation der IL-4R-Variante Q576R mit einer frühzeitigen Transplantatabstoßung nach durchschnittlich zwei Jahren [103]. Die Untersuchung der Patienten vor der Transplantation auf den Q576R-Polymorphismus birgt die Möglichkeit, Hochrisikopatienten hinsichtlich einer frühen Transplantatabstoßung zu erkennen und frühzeitig die entsprechenden therapeutischen Maßnahmen einzuleiten.

In der Studie von Hershey et al. konnte gezeigt werden, dass das Vorliegen eines in diesem Sinne polymorph veränderten Allels mit einer höheren Expression von CD23 durch das IL-

4 assoziiert ist. Diese erhöhte Sekretion scheint mit einer Änderung der Bindungsspezifität des benachbarten Tyrosinrests an der Position 575 für Signaltransduktionsmoleküle einherzugehen [112]. Das würde wiederum dafür sprechen, dass der Gln576Arg-Polymorphismus eine erhöhte Affinität für IL-4 am Rezeptor bedingt.

Caggana et al. wiesen in ihrer Studie von 1999 darauf hin, dass das Vorliegen von Polymorphismen auch ethnischen Einflüssen unterliegt. So konnte er für zwei IL-4-Rezeptorpolymorphismen (Gln551Arg und Ile50Val) zeigen, dass mehr Schwarze das Ile50-Allel und dagegen mehr Weiße das Arg551-Allel tragen. Allerdings wiesen signifikant mehr schwarze Menschen beide Polymorphismen auf [55].

Bei einer genetischen Untersuchung von Mastozytose-Patienten hinsichtlich des Gln576Arg-Polymorphismus wiesen Daley et al. nach, dass die Träger dieser Veränderung eine geringere Mastzelllast im Blut und leichtere Krankheitsverläufe haben [67]. Die Ursache dafür scheint darin zu liegen, dass IL-4 die Fähigkeit besitzt, das Wachstum und die Differenzierung von Mastzellen zu hemmen und gleichzeitig deren Apoptose zu induzieren [202, 212, 289]. Die Konsequenz daraus würde bedeuten, dass der Gln576Arg-Polymorphismus für eine höhere Affinität von IL-4 am Rezeptor verantwortlich ist, da mehr Apoptosevorgänge aktiviert werden. Bereits von Wang et al. wurde beschrieben, dass dieser Polymorphismus mit wachsender Sensitivität der IL-4-rezeptortragenden Zellen auf IL-4 einhergeht [280].

1.3 Zielsetzung

Da die bullösen Dermatosen BP und PV Autoimmunerkrankungen sind [30, 31] und vermutlich auch Apoptosevorgänge [239] bei der Pathogenese eine Rolle spielen, weisen die bisherigen Erkenntnisse darauf hin, dass IL-4 einen Einfluss auf die Erkrankung hat. Bei BP- und PV-Patienten lassen sich erhöhte IL-4-Spiegel in der Blasenflüssigkeit nachweisen [19, 115, 167, 224, 242, 288]. IL-4 gilt als typisches Zytokin der Th2-Zellen und somit besteht der Verdacht, es könnte sich bei den bullösen Dermatosen um eine Th2-vermittelte Erkrankung handeln. Bisher gibt es nur wenige Hinweise, die in diese Richtung deuten [113, 115]. Lin et al. gehen davon aus, dass die T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle bei der Produktion der Auto-Antikörper spielen [167]. Es ist bekannt, dass der Gln576Arg-Polymorphismus mit verstärkter Affinität des IL-4 an den IL-4-Rezeptor einhergeht [112, 280]. Damit besteht vermehrte IL-4-Wirkung.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, BP- und PV-Patienten auf den IL-4-Rezeptorpolymorphismus Gln576Arg hin zu untersuchen. Weiterführend wurde versucht, den Gentotyp mit klinischen Kriterien zu assoziieren, um zu zeigen, ob die genetische Veränderung Einfluss auf Pathogenese und klinischen Verlauf hat. Man ging davon aus, dass sich eine verstärkte IL-4-Wirkung klinisch in schwererem Verlauf niederschlagen könnte. Assoziationen würden dafür sprechen, dass es sich um Th2-vermittelte Autoimmundermatosen handelt, da IL-4 ein typisches Th2-Zytokin ist. Mit der Möglichkeit, die Therapie zu modifizieren und damit eine bessere Prognose zu erreichen, könnten sich für Patienten wichtige Neuerungen ergeben.

Würde sich der Einfluss von genetischen Veränderungen auf beispielsweise der Zytokinebene bei den bullösen Dermatosen bestätigen, so wäre ein erstrebenswertes Ziel, ein umfassendes genetisches Untersuchungsprogramm zu entwickeln. Dabei würde man auf laborchemischem Weg Blutproben hinsichtlich verschiedener Polymorphismen untersuchen. Man könnte mit dem Ergebnis der Polymorphismuskonstellation die Diagnose erleichtern und gegebenenfalls individuelle Aussagen im Hinblick auf die Prognose des Patienten treffen und entsprechend modifizierte Therapiemaßnahmen einleiten beziehungsweise entwickeln.

Für die Untersuchung erschien es am günstigsten eine Fall-Kontroll-Studie zu konzipieren. Bei diesem Studientyp, der auf dem Vergleich von Fällen und Kontrollen beruht, können auch bei geringen Fallzahlen aussagekräftige Erkenntnisse getroffen werden.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten- und Kollektivbeschreibung

2.1.1 BSD-Gruppe

Die deutsche Studiengruppe BSD (**B**ullous **S**kin **D**iseases) wurde im Jahre 1997 von zwei Mitarbeitern der dermatologischen Universitätskliniken Mannheim beziehungsweise München gegründet. Der Vertreter der Klinik Mannheim war Prof. Dr. med. Berthold Rzany (heute in der Dermatologie der Charité Mitte Berlin, dEBM, tätig) und die Dermatologie der LMU München wurde von PD Dr. med. Gerald Messer vertreten. Heute sind insgesamt sieben deutsche Universitätskliniken an der Studiengruppe beteiligt.

Die BSD-Gruppe beschäftigt sich mit der Erforschung der Pathogenese blasenbildender Dermatosen. Hierbei werden sowohl epidemiologische, als auch immunologisch-genetische und pathophysiologische Fragestellungen untersucht.

Diese Arbeitsgruppe hat eine umfassende Datenbank angelegt, in die Patienten mit diversen bullösen Hauterkrankungen und gesunde Kontrollpatienten (im Nachfolgenden als „BSD-Kontrollen“ bezeichnet) mit deren Einverständnis (Patienteninformation und Einverständniserklärung siehe Anhang ab Seite 145) aufgenommen wurden.

Bis heute konnten anhand eines ausführlichen Fragebogens ca. 1000 Patienten mit bullösen Dermatosen und Kontrollpatienten retro- und prospektiv erfasst werden.

Im Rahmen der retrospektiv angelegten Studie sind 700 Erkrankte beziehungsweise Kontrollpatienten in die Datenbank der BSD-Gruppe aufgenommen worden. Seit 1997 konnten ca. 300 Patienten mit neu diagnostizierten bullösen Dermatosen prospektiv in die Erfassung eingehen.

Bei insgesamt 109 der retro- und prospektiv erfassten BP- oder PV-Patienten beziehungsweise Kontrollpersonen erfolgte nach deren Einverständnis eine Isolierung von genomischer DNA für diese Studie. Eine Unterscheidung in retro- und prospektiv war hinsichtlich dieses Studientyps nicht nötig, da nur Kriterien des Fragebogens für diese Untersuchung relevant waren, die bereits erfasst waren und nicht prospektivisch kontrolliert werden mussten.

PD Dr. med. Gerald Messer hat sein mehreren Jahren eine DNA-Sammelbank angelegt, die DNA von Patienten mit diversen Erkrankungen beinhaltet. Die Patienten waren mit genetischen Untersuchungen ihres Erbmaterials zu Forschungszwecken einverstanden. Unter diesen Patienten sind 150 mit systemischer Sklerodermie, 150 mit atopischem Ekzem, 180 mit Lupus erythematodes und auch 280 Patienten mit verschiedenen bullösen Dermatosen. Auch ein Teil dieser Patienten konnte in die vorliegende Arbeit mit aufgenommen werden.

Zusätzlich geht eine Zahl von gesunden Kontrollpersonen (im Folgenden als „gesunde Kontrollen“ bezeichnet) in die Studie ein. Diese setzen sich aus Studenten der LMU und Mitarbeitern des Labors von Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß im Institut für Anthropologie und Humangenetik der LMU München zusammen.

2.1.1.1 Fragebogen

Der bereits erwähnte Fragebogen zur Erfassung der Patienten für die Datenbank der BSD-Gruppe setzt sich aus drei Teilen zusammen.

Zum einen besteht er aus Daten, die aus der Krankenakte des Patienten entnommen beziehungsweise im persönlichen Gespräch korrigiert und ergänzt werden konnten. Hierbei geht es beispielsweise um Daten zur Person, zum Entstehungszeitpunkt der Erkrankung, zu weiteren Erkrankungen.

Im Gespräch mit dem Patienten, dem zweiten Teil des Fragebogens, konnte zusätzlich auch nach der Familienanamnese, Risikofaktoren und demographischen Daten gefragt werden. Darüber hinaus bot dieser Teil der Datenerhebung die Möglichkeit, sich ein Bild von der Ausdehnung des Hautbefalls und der eventuellen Schleimhautbeteiligung zu machen.

Im letzten Teil des Fragebogens wurden Daten zur Lebensqualität des Patienten erfasst. Die Grundlage hierzu war der **Dermatology Life Quality Index (DLQI)** nach A.Y. Finlay et al. [82].

Die für die vorliegende Studie relevanten Auszüge aus dem Fragebogen sind im Anhang abgedruckt (ab Seite 130).

2.1.1.2 Erfassung der Patientendaten

In die Datenerfassung dieser Studie gingen nur Patienten ein, die entweder BP oder PV als gesicherte Diagnose hatten oder als Kontrolle gewertet werden konnten. Patienten, bei de-

nen die Erkrankung nicht eindeutig war, konnten nicht berücksichtigt werden und wurden nicht in die Studie aufgenommen.

Die Sicherung der Diagnose lag in der Hand der einzelnen Kliniken, die an der BSD-Gruppe beteiligt sind. Laut Vereinbarung musste die Diagnose durch das klinische Bild, die Histologie und/oder direkte beziehungsweise indirekte Immunfluoreszenz verifiziert werden. Der Patient musste in der betreffenden Klinik als BP- beziehungsweise PV-Patient geführt und behandelt werden.

Kontrollen waren Patienten, die wegen einer akuten Erkrankung in z. B. der Augenklinik, Chirurgie oder auch Dermatologie behandelt wurden und einverstanden waren, sich in die BSD-Datenbank aufnehmen zu lassen. Wesentlich war, dass bei den Patienten keine blasenbildende Hauterkrankung oder andere Autoimmunerkrankung bekannt sein durfte.

Die in den einzelnen BSD-Zentren ausgefüllten Fragebögen wurden an den medizinischen Dokumentar Ronald Sinkgraven (erst Dermatologische Uniklinik Mannheim, jetzt an der Charité Berlin Mitte) geschickt und von ihm zu einer großen Datenbank zusammengefasst und verwaltet.

Von allen betreffenden Patienten wurden parallel zur Fragebogenerfassung mit deren Einverständnis Blutproben zur DNA-Isolierung und Untersuchung auf DNA-Ebene an die Dermatologische Universitätsklinik der LMU München gesendet. Dabei musste jeweils ein Vermerk über die persönlichen Patientendaten (Name, Geburtsdatum), Hinweise auf das absendende BSD-Zentrum und die gesicherte Diagnose (BP, PV oder Kontrolle) beiliegen.

2.1.2 Vorstellung studienrelevanter Kriterien

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 362 Patienten auf DNA-Ebene hinsichtlich des IL-4-Rezeptor-Polymorphismus untersucht. Dieses Kollektiv setzt sich zusammen aus 123 Patienten mit BP, 31 Patienten mit PV und 208 Kontrollen. Die Kontrollgruppe besteht sowohl aus 73 eigens für die BSD-Studie ausgewählten Kontrollpatienten als auch zusätzlich aus 135 gesunden Personen.

In der Datenbank der BSD-Gruppe waren nur sehr wenige Patienten erfasst, die an Pemphigus foliaceus erkrankt waren. Daher wurden sie nicht mit berücksichtigt und gehen in die vorliegende Studie nicht ein.

Von dieser Gesamtmenge an untersuchten DNAs waren in der Datenbank der BSD-Gruppe 109 Patienten per Fragebogen ausführlich erfasst. Wenn diese Zahl näher aufgeschlüsselt

wird, ergeben sich folgende Zahlen: 69 Patienten mit BP, 21 Patienten mit PV und 19 Kontrollpatienten.

Im Diagramm 1 (Seite 44) ist die Verteilung der einzelnen Kollektivgruppen dargestellt. Die beiden verschiedenen Säulen zeigen jeweils den Anteil an den insgesamt untersuchten Patienten (blau) und den Anteil der Patienten, der in der Datenbank der BSD-Gruppe erfasst (rot) ist.

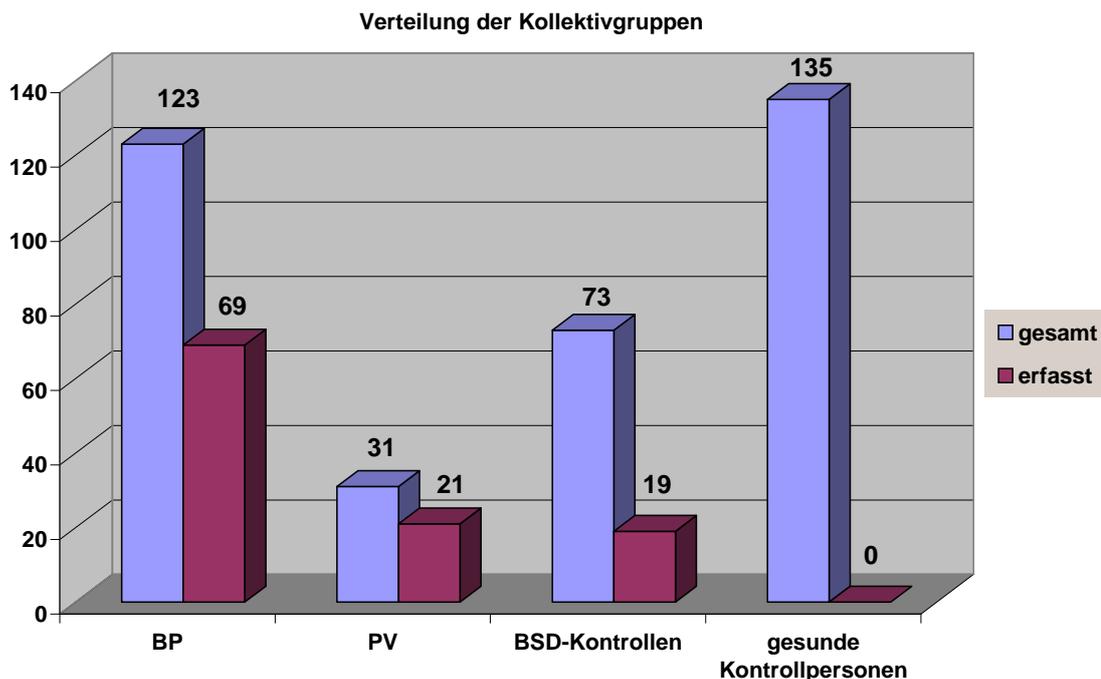


Diagramm 1: Verteilung der Kollektivgruppen nach Diagnosen beziehungsweise Kontrollen. Die blauen Säulen repräsentieren alle Personen der jeweiligen Gruppe, die roten Säulen symbolisieren die mit BSD-Fragenbogen erfassten Personen. Die Zahlen stehen für die Anzahl n der jeweiligen Personen.

2.1.2.1 Geschlechtsverteilung

Von den insgesamt 362 Patienten, die auf den IL-4-Rezeptor-Polymorphismus hin untersucht wurden, war bei 221 das Geschlecht bekannt. Bei den 135 gesunden Kontrollpersonen, die zusätzlich typisiert wurden, war das Geschlecht nicht dokumentiert. Daher konnten diese Kontrollen nicht in die nachfolgende Übersicht mit eingehen.

Die 227 untersuchten Patienten der BSD-Studie konnten bis auf sechs alle in die Übersicht über die Geschlechtsverteilung aufgenommen werden. Bei sechs (vier Kontrollen, zwei PV) Patienten war das Geschlecht nicht nachvollziehbar.

47 (38.2%) BP-Patienten sind männlich, 76 (61.8%) sind weiblich. Bei den PV-Erkrankten sind 12 (41.4%) männlichen und 17 (58.6%) weiblichen Geschlechts. Die Kontrollpatienten lassen sich in 28 (40.6%) Männer und 41 (59.4%) Frauen aufteilen (siehe Diagramm 2, Seite 44).

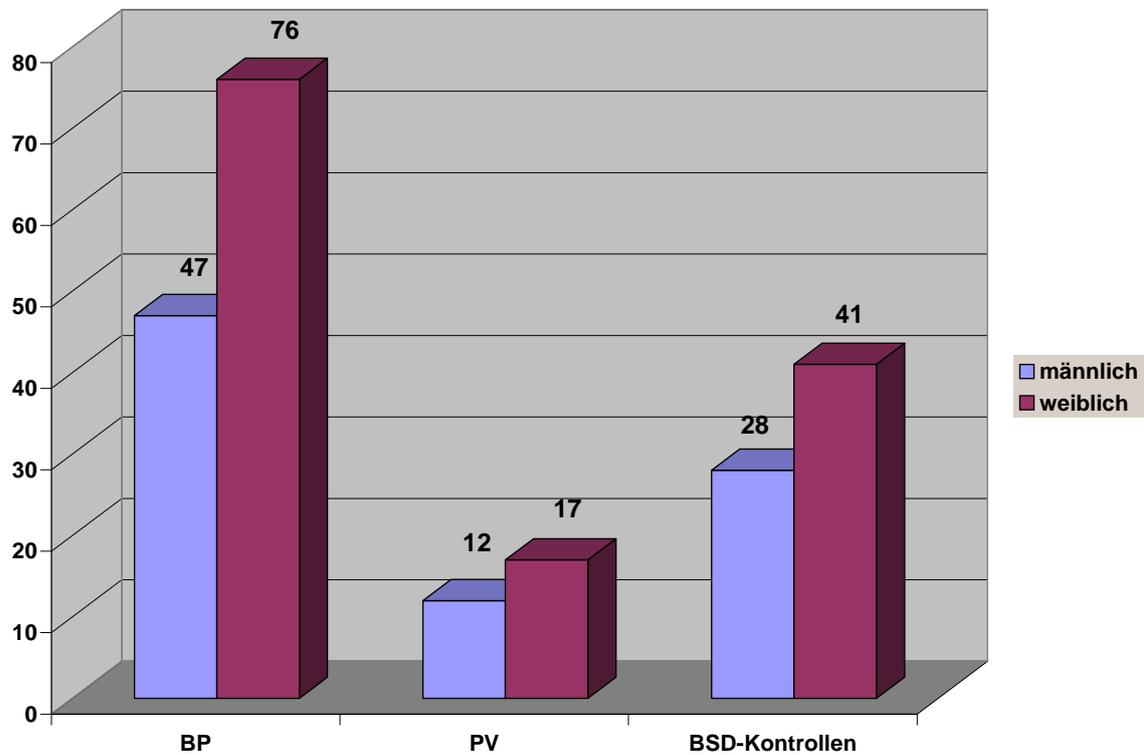


Diagramm 2: Geschlechtsverteilung nach Diagnosen aller Patienten. Die blauen Säulen repräsentieren die männlichen Personen, die roten Säulen stehen für die weiblichen Personen der jeweiligen Gruppe. Die Zahlen bezeichnen die Anzahl n der Personen.

Bei allen erfassten und typisierten Patienten beziehungsweise Kontrollen war das Geschlecht bekannt. 24 (34.8%) der BP-Patienten waren Männer und 45 (65.2%) waren Frauen. Die PV-Patienten sind zu 47.6% männlich (n = 10) und zu 52.4% (n = 11) weiblich. Die Kontrollen teilen sich zu 15.8% (n = 3) in Personen männlichen und zu 84.2% (n = 16) in Personen weiblichen Geschlechts. Wenn nur die per Fragebogen erfassten Patienten in einem Diagramm über die Geschlechtsverteilung gezeigt werden, ergibt sich folgendes Bild (siehe Diagramm 3, Seite 46).

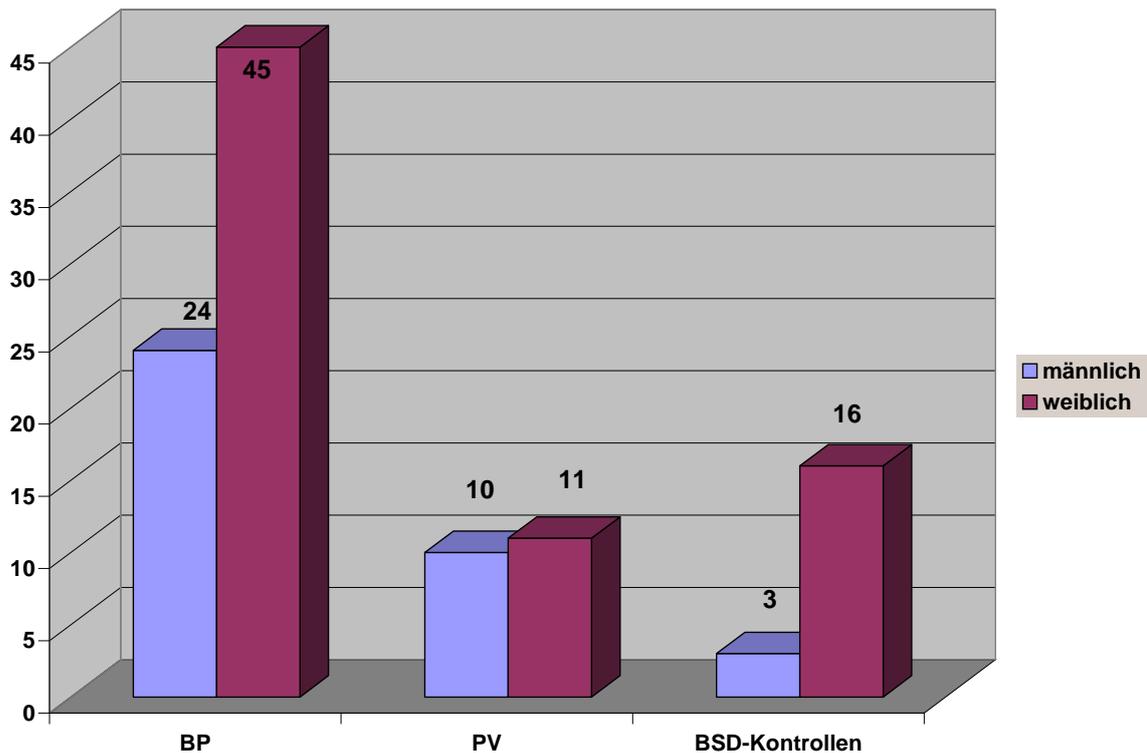


Diagramm 3: Geschlechtsverteilung nach Diagnosen der mittels Fragebogen erfassten Patienten. Die blauen Säulen repräsentieren die männlichen Personen, die roten Säulen stehen für die weiblichen Personen der jeweiligen Gruppe. Die Zahlen bezeichnen die Anzahl n der Personen.

Die ungefähr gleiche Geschlechtsverteilung beim PV entspricht den bisherigen Erkenntnissen, dass es bei dieser Erkrankung keinen Geschlechtsunterschied gibt [245].

Nach einer Veröffentlichung von Schmidt et al. ist beim bullösen Pemphigoid die Geschlechtsverteilung nahezu ausgeglichen [243]. Es gibt Hinweise von Jung et al., dass Männer doppelt so häufig betroffen sind [145]. Im Diagramm ist die Verteilung der Geschlechter bei BP zwar unterschiedlich, aber in den weiterführenden Untersuchungen und Auswertungen dieser Studie spielt dieser Unterschied keine wesentliche Rolle beziehungsweise wird in der Datenauswertung berücksichtigt.

Wenn man die Verteilung der Geschlechter bei den beiden bullösen Dermatosen hinsichtlich aller untersuchten beziehungsweise der erfassten Patienten vergleicht, differieren die Ergebnisse kaum. Bei den Kontrollpatienten sind in der Gruppe „alle untersuchten Patienten“ die Geschlechter annähernd gleich (40.6% zu 59.4%) verteilt. Bei den per Fragebogen Erfassten liegt die Verteilung deutlich auf der Seite der Frauen (15.8% Männer zu 84.2% Frauen), was vermutlich durch die kleinen Fallzahlen in diesem Bereich erklärbar ist. Aber auch dieser Unterschied ist nachfolgend berücksichtigt beziehungsweise unwesentlich.

2.1.2.2 Entstehungsalter

Bei den per Fragebogen erfassten Patienten der beiden bullösen Erkrankungen beziehungsweise der BSD-Kontrollen wurde das Entstehungsalter der jeweiligen Krankheit untersucht. Hinsichtlich der Verteilung des Erkrankungsalters der BP- beziehungsweise PV-Erkrankten zeigt sich, dass das Ersterkrankungsalter des Kollektivs dieser Studie den derzeitigen wissenschaftlichen Erkenntnissen entspricht.

Am BP erkranken meist ältere Menschen [188, 243]. Der Altersgipfel wird nach dem 7. Lebensjahrzehnt angegeben [42, 184]. In einer Veröffentlichung von Bastuji-Garin et al. wird sogar von einer Häufung bereits ab dem 65. Lebensjahr gesprochen [24].

Im Gegensatz dazu sind vom Pemphigus vulgaris im Regelfall Menschen des mittleren Lebensalters betroffen [188, 245]. Der Erkrankungsgipfel wird recht ungenau zwischen 40 und 60 Jahren angegeben [42]. Bei Kindern und Personen über dem 75. Lebensjahr tritt die Erkrankung nur selten auf [140].

Der Mittelwert \pm SD (5%-Perzentile, 25%-Perzentile, Median, 75%-Perzentile, 95%-Perzentile) des Entstehungsalters beträgt bei den 69 erfassten BP-Patienten 74.3 ± 13.3 . (50.1, 67.7, 75.9, 84.2, 91.4). Nach dem Shapiro-Wilk-Test wurde dieses Kollektiv als normalverteilt [0.0006] errechnet. Die Gruppe der 18 PV-Patienten (bei drei der ursprünglich 21 Patienten war kein Entstehungsalter erfasst) hat als Mittelwert 53.1 ± 15.1 (18.1, 46.0, 51.6, 67.1, 72.6) und bei den 19 Kontrollen (nur erfasste Patienten - die gesunden Kontrollpersonen wurde nicht berücksichtigt!) konnte ein Altersdurchschnitt von 66.4 ± 16.0 (22.0, 60.0, 71.3, 75.6, 88.9) ermittelt werden. Auch das Kontrollkollektiv ist nach dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt [0.0480]. Die PV-Patienten unterliegen nach diesem Test keiner Normalverteilung [0.2211].

Das Ergebnis über die Normalverteilung ist im Hinblick auf weitere statistische Tests von Bedeutung und wird entsprechend berücksichtigt.

Die Kontrollen liegen aufgrund der Altersverteilung mit einem Mittelwert von 66.4 zwischen den Werten der beiden Gruppen mit den erkrankten Patienten. Deswegen scheinen die Erkrankungsgruppen durchaus für die nachfolgenden Auswertungen vergleichbar zu sein (siehe Diagramm 4, Seite 48).

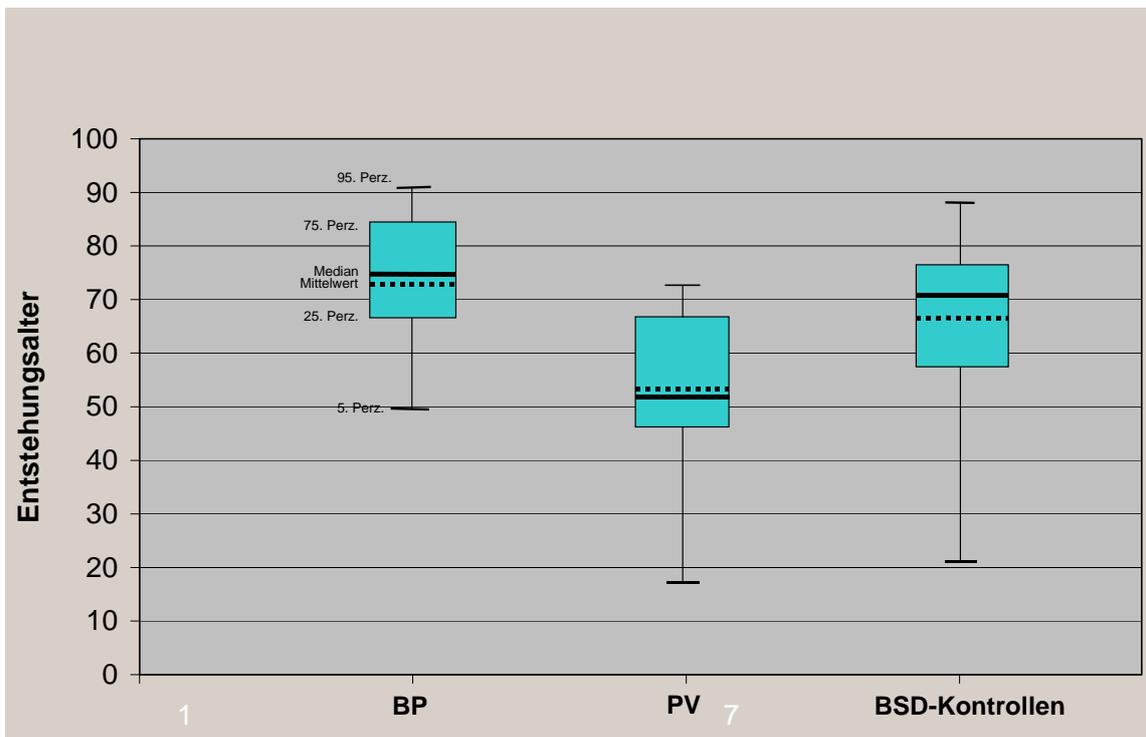


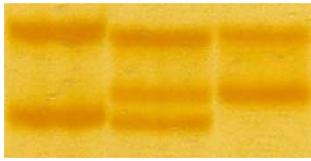
Diagramm 4: Boxplotübersicht über das Entstehungsalter von BP, PV und BSD-Kontrollen. Die Zahlen bezeichnen die Anzahl n der Personen. Am linken Boxplot sind stellvertretend für die anderen beiden Boxplots Median, Mittelwert, 5./ 25./ 75. und 95. Perzentile eingetragen.

2.1.3 Hinführung auf die Studie

Das Ziel der vorliegenden Studie war zu untersuchen, ob das Vorliegen des IL-4-Rezeptor-Polymorphismus an der Position -576 mit einer Häufung bestimmter Krankheitskriterien der bullösen Dermatosen BP beziehungsweise PV assoziiert ist. Hierbei lag das Augenmerk auf klinischen Gesichtspunkten im Sinne von *Severity*-Kriterien, die auf eine stärkere Ausprägung beziehungsweise einen früheren Krankheitsausbruch hindeuten.

Im Experiment wurden die Patienten und Kontrollen des beschriebenen Kollektivs mittels PCR und SSCP-(*Single-Strand-Conformational-Polymorphism*)-Gel-Analyse auf den IL-4-Rezeptor-Polymorphismus hin untersucht. Die mögliche genetische Konstellation der beiden Allele im Genmaterial kann in drei verschiedenen Formen vorliegen und mittels des SSCP-Gels visualisiert werden. „QQ“ bedeutet, dass die Patienten homozygot für das „gesunde“ Allel sind. Bei „RQ“ liegt eine Heterozygotie vor, das heißt, die Personen tragen sowohl das „gesunde“ Allel „Q“, als auch das „kranke“ beziehungsweise polymorph veränderte Allel „R“. Wenn die Kombination „RR“ vorliegt, sind die betroffenen Menschen

homozygot für den polymorph veränderten IL-4-Rezeptor (siehe Abbildung 10, Seite 49). Einzelheiten zum SSCP-Gel finden sich im Kapitel 2.3.4 (Seite 57).



RR RQ QQ

Abbildung 10: Ausschnitt eines SSCP-Gels. Repräsentiert sind beispielhaft die unterschiedlichen Allelkombinationen. „RR“ bezeichnet Homozygotie für das erkrankte Allel, „RQ“ entspricht einer heterozygoten Ausprägung, „QQ“ steht für eine homozygote Form einer gesunden Person ohne Polymorphismus. Somit lassen sich die drei verschiedenen Genotypen anhand der unterschiedlichen Bandenmuster sicher differenzieren.

2.2 Material

Die Blutproben stammen aus den oben beschriebenen Studienkollektiven. Im Rahmen des Laborversuchs der vorliegenden Arbeit wurde aus den Blutproben mittels zweier verschiedener Methoden die DNA-Isolierung vorgenommen.

2.2.1 Isolation der DNA mittels Fällungsmethode

Für 3 ml Natriumheparinat-Blut:

- Erylysepuffer (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 und 1 mM EDTA)
- PBS (200 ml 10 x PBS auf 1000 ml Aqua dest.)
- reiner $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$

2.2.2 Isolation der DNA mittels Qiagen

Die DNA-Isolierung wurde mittels QIAamp[®] DNA Mini Kit nach Anleitung vorgenommen.

2.2.3 PCR

Verwendete Reagenzien für PCR:

- Primer: IL-4R 1665s; 5'- CCG AAA TGT CCT CCA GCA TG - 3'; 1 µg/µl; MWG Biotech GmbH; 3-4142-1/3
- Primer: IL-4R 1820as; 5' - GAG AAG GCC TTG CCA GC - 3'; 1 µg/µl; MWG-Biotech GmbH; 3-4142-3/3
- Puffer: 10 x PCR Buffer (ohne MgCl₂); 1.5 ml; Perkin Elmer/manufactured by Roche; F2148 3/ 31/ 98
- MgCl₂-Lösung: MgCl₂ Lösung; 25 mM, 1.5 ml; Perkin Elmer/manufactured by Roche; F2145 3/31/98
- Taq-Polymerase: Taq-DNA-Polymerase; Storage Buffer B; 500 U, 5 U/µl; Promega; Madison WI USA; 608-274.4330; M166B 11857508

Technisches Gerät zur Durchführung der PCR:

PCR-Cycler Gene Amp PCR-System 9600

2.2.4 Gelelektrophorese zur Amplifikatkontrolle

Benötigte Reagenzien:

- 1.5 mg Agarose (High Strength Analytical Grade)
- 100 ml TBE-Puffer (bestehend aus 890 mM Tris reinst, 890 mM Borsäure und 20 mM EDTA, pH 8.0)
- 1.5 µl Ethidiumbromid
- 6 x Auftragspuffer mit Farbindikator Bromphenolblau

Technisches Gerät:

- Gelelektrophoresekammer mit anfangs 50 V, später 80 V Spannung
- UV-Transilluminator
- Sofortbild-Polaroidkamera unter Vorschaltung eines Rotfilters

2.2.5 Reinigung des PCR-Amplifikats

Die Aufreinigung des PCR-Amplifikats wurde mittels des High Pure PCR Product Purification Kits der Firma Boehringer nach Anleitung vorgenommen.

2.2.6 SSCP-Gel

Benötigtes Material zur Herstellung eines 8%-Agarosegels:

- 3 ml Tris-Sulfat-Puffer (200ml Stammlösung besteht aus 140 ml Aqua dest., 0.43 ml H₂SO₄, ca. 9 g Tris-Base zur Einstellung des pH auf 9.0)
- 4 ml 29.1% Acrylamid - 0.9% Piperazindiacrylamid
- 5.5 µl Temed (Tetramethyl-Ethylendiamin)
- 105 µl APS 10%
- 8 ml Aqua bidest.

Benötigtes Material und Herstellung der Agaroseblöcke:

- 250 ml 0.5 M Tris-Borat-Puffer (Borsäure 0.14 M)
- 5 g Agarose High EEO research grade
- 0.01% Bromphenolblaulösung (je nach Schalengröße so viel, dass Agarosegel bedeckt ist)

Technisches Gerät zur Durchführung der Elektrophorese:

Multiphor II Electrophoresis Unit 2117 und Power support 2197 bei 1000 V, 15 mA, 15 W und 10 °C

2.2.7 Silberfärbung

- 10% Ethanol/ 0.5% Essigsäure
- 0.1% AgNO₃
- 1.5% NaOH/ 0.015% NaBH₄/ 0.6% Formaldehyd (37%)
- 0.75% Na₂CO₃ oder H₂O dest.

2.2.8 Statistische Ergebnisauswertung

Die Auswertung der Daten und die Signifikanzberechnung erfolgten mit dem Statistical Analysis System (SAS®).

2.3 Methoden

2.3.1 DNA-Isolierung

Da die verwendeten Blutproben nicht nur aus München, sondern auch aus weiter entfernten Universitätskliniken anderer an der BSD-Gruppe beteiligter Städte (Aachen, Bonn, Dresden, Erlangen, Kiel, Mannheim und Würzburg) stammten, mussten zur notwendigen DNA-Isolierung zwei verschiedene Methoden angewendet werden. Der Grund dafür liegt darin, dass Blut, das älter als eine Woche ist, mit einer „klassischen“ Fällungsmethode oft nicht mehr erfolgreich bearbeitet werden konnte.

2.3.1.1 DNA-Isolierung durch Fällungsmethode mit C₂H₅OH

Für Blutproben, die frisch gewonnen waren, wurde die DNA wie folgt isoliert:

Zu 3ml Blut, das in ein Röhrchen mit Natriumheparinat abgenommen wurde, wurden 50ml Erylysepuffer (bestehend aus: 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ und 1 mM EDTA) gegeben, um die Wände der enthaltenen Erythrozyten zu zerstören. Um den Lösungsprozeß zu verbessern, wird die Probe für 20min auf dem Labormischrad gedreht. Nach 20min zentrifugieren bei 2000 r/min in der Heraeus-Zentrifuge, wurde der Überstand dekantiert. Danach wurde das Gefäß zweifach mit PBS (200 ml 10 x PBS auf 1000 ml Aqua dest.) ausgespült. Nach der Zugabe von 1000 µl DNAzol Reagenz (Guanidine-Isocyanate) wurde das entstandene Gemisch mit der Pipette mehrfach aufgesogen und wieder abgegeben, um

eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Auf die Überführung der vorliegenden Flüssigkeit in ein 2 ml-Eppendorfgefäß folgte die Bildung eines sichtbaren DNA-Fadens. Anschließend erfolgte die Auffüllung mit reinem C₂H₅OH, eine kurze Dekantierung und eine Überführung des DNA-Fadens mittels einer sterilen Pipettenspitze in ein neues Eppendorfgefäß mit reinem C₂H₅OH, um Verunreinigungen zu vermeiden. Die nun vorliegende gefällte und isolierte DNA wurde bis zum weiteren Gebrauch für die PCR bei -20 °C tiefgefroren.

2.3.1.2 DNA-Isolierung mittels QIAamp® DNA Mini Kit

Da etliche Blutproben aufgrund des längeren Postwegs erst später bearbeitet werden konnten, wurde die DNA-Isolierung mittels QIAamp® DNA Mini Kit von der Firma Qiagen vorgenommen. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung:

Es wurden 20 µl Qiagen-Protease (oder Proteinkinase K) in ein 1.5 ml-Eppendorfgefäß pipettiert und anschließend 200 µl der Blutprobe hinzugefügt. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Puffer AL aus dem Qiagen-Kit. Die Durchmischung wurde für 15 sec auf einem Labormischer durchgeführt. Anschließend wurde die Mischung für 10 min bei 56 °C inkubiert. Um zu vermeiden, dass sich kleine Tröpfchen am oberen Rand und Deckel des Eppendorfgefäßes befinden und somit ein Teil verloren geht, wurde kurz zentrifugiert. Es wurden danach 200 µl Ethanol (96 - 100%) hinzugefügt, kurz auf dem Vortex-Gerät durchmischt und wiederum kurzzeitig zentrifugiert. Nach Überführung der Mischung in die im Kit enthaltene *QIAamp spin column* wurde für 1 min bei 8000 r/min zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule vorsichtig auf ein Qia-Sammelgefäß aufgesteckt. Nach Zugabe von 500 µl Puffer AW2 erfolgte für 3 min bei 14000 r/min eine Zentrifugation. Nun wurde die Qia-Säule auf ein sauberes 1.5 ml-Eppendorfgefäß gesteckt und 200 µl des Puffers AE oder destilliertes Wasser hinzupipettiert. Als letzter Schritt erfolgte eine kurze Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur und eine letzte Zentrifugation für 1 min bei 8000 r/min. Schließlich wurde das Eppendorfgefäß mit der nun enthaltenen DNA bei -20 °C eingefroren.

2.3.2 Zugabe von EDTA

Um die Aktivität von DNA-zerstörenden Endonukleasen durch Bakterien einzudämmen, wurde zu den frisch isolierten und gewaschenen DNAs EDTA in einer Endkonzentration

von 2 mM zugegeben. EDTA hat als Chelatbildner den Effekt, zweiwertige Ionen (z.B. Mg^{2+}) abzufangen, die für die Endonukleasetätigkeit nötig sind.

2.3.3 Methodik zur Untersuchung des IL-4-Rezeptor-Polymorphismus

2.3.3.1 Verdünnung der DNA-Proben

Da sich im Versuch gezeigt hat, dass sich in der PCR und auf dem SSCP-Gel mit einer Reduzierung der vorliegenden DNA-Konzentration wesentlich vorteilhaftere Ergebnisse erreichen lassen, wurden sämtliche DNA-Proben auf eine Konzentration von 50 ng/ μ l mittels Aqua bidest. verdünnt. Hierbei wurden aus der DNA mit Hilfe von Aqua bidest. eine 1 : 100- und eine 1 : 200-Verdünnung hergestellt und die optische Dichte (OD) nach einstellen mit reinem Aqua bidest. im Photometer mittels 260 nm-Filter gemessen. Der Extinktionswert der 1 : 100-Verdünnung muss mit einer geringen Toleranz das Doppelte des Wertes der 1 : 200-Verdünnung betragen. Anschließend wurde die notwendige Verdünnung nach folgender Formel berechnet:

Extinktion $E \cdot 100$ beziehungsweise 200 (je nach Verdünnung) $\cdot 50$ (DNA-Faktor) = y ng/ μ l

y ng/ μ l : 50 ng/ μ l = z

z = die notwendige Verdünnung

2.3.3.2 Amplifizierung des betreffenden Genabschnitts mittels PCR

Die Herstellung des für die Untersuchung des IL-4-Rezeptor-Polymorphismus benötigten Amplifikats erfolgte mittels PCR. Hierbei wurden für jeweils 18 μ l Stammlösung 2 μ l der jeweiligen DNA-Probe verwendet. Die Stammlösung wurde nach folgendem Rezept auf Eis angesetzt:

(Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Menge pro Probe und wurden entsprechend der Probenanzahl inklusive eine Leerprobe mit Aqua bidest. vervielfacht)

- 2 μ l MgCl-free 10 x Puffer
- 2 μ l Nukleotid-Mix 2 mM aus dATP, dCTP, cGTP und dTTP
- 1 μ l $MgCl_2$
- 1 μ l Primer 3' [verdünnt mit Aqua bidest. auf 50 ng/ μ l]

- 1 µl Primer 5' [verdünnt mit Aqua bidest. auf 50 ng/µl]
- 0.1 µl Taq-Polymerase
- 10.9 µl Aqua bidest.

Wenn Proben amplifiziert wurden, die deutlich weniger als 50 µg/µl DNA bei der OD-Messung erreichten, wurde ein Mastermix nach folgendem Rezept verwendet, um mehr DNA einsetzen zu können:

- 2 µl MgCl-free 10 x Puffer
- 2 µl Nukleotid-Mix 2 mM aus dATP, dCTP, cGTP und dTTP
- 1 µl MgCl₂
- 1 µl Primer 3' [verdünnt mit Aqua bidest. auf 50 ng/µl]
- 1 µl Primer 5' [verdünnt mit Aqua bidest. auf 50 ng/µl]
- 0.1 µl Taq-Polymerase
- 8.9 µl Aqua bidest.

Von diesem Mastermix wurden pro Probe nur 16 µl zu einem DNA-Volumen von 4 µl pipettiert. Alle verwendeten Reagenzien und Proben wurden nach dem Entnehmen aus dem Kühl- beziehungsweise Gefrierschrank auf Eis gelagert, um eine Erwärmung über 4 °C zu vermeiden. Sowohl die Primer als auch die zu untersuchenden DNA-Proben wurden nach dem schonenden Auftauen auf Eis einzeln auf einem Vortex-Gerät durchmischt. Jeweils 18 µl beziehungsweise 16 µl der Stammlösung wurden entsprechend der Probenanzahl inklusive einer Aqua-Leerprobe auf Eis in die kleinen Gefäße der PCR-Streifen vorgelegt. Anschließend wurden 2 µl beziehungsweise 4 µl der jeweiligen DNA-Probe beziehungsweise des Aqua bidest. dazupipettiert und durch aufsaugen und abpipettieren gut durchmischt.

Im PCR-Cycler Gene Amp PCR-System 9600 lief die PCR unter folgenden Bedingungen:

Anfangsdenaturierung	einmalig für	10 min bei 96 °C
Denaturierung	30 Zyklen für	30 sec bei 94 °C
Annealing	30 Zyklen für	30 sec bei 60 °C
Extension	30 Zyklen für	60 sec bei 72 °C
Letzter Zyklus Extension	einmalig für	10 min bei 72 °C

2.3.3.3 Gelelektrophorese zur Amplifikatkontrolle

Um sicherzugehen, dass das richtige DNA-Stück amplifiziert wurde, erfolgte eine Auftrennung im elektrischen Feld mittels einer Gelelektrophorese. Anhand eines 1-kb-Größenstandards, der sich in mehrere Basenlängen auftrennt, kann mit Hilfe einer Schablone die im Gel vorliegende Basenlänge des Amplifikats abgelesen werden.

Das Gel wurde aus 1.5 mg Agarose (*High Strength Analytical Grade*), 100 ml TBE-Puffer (bestehend aus 890 mM Tris reinst, 890 mM Borsäure und 20 mM EDTA, pH 8.0) und 1.5 µl Ethidiumbromid gemischt und aufgeköcht, um die Agarose zu lösen. Wenn die vorliegende Flüssigkeit homogen erschien, wurde die durch Verdampfen verlorengegangene Menge mit Aqua bidest. aufgefüllt und anschließend die Mischung in eine vorbereitete Schale mit eingesetzten Kämmen gegossen. Nach Erkalten der Flüssigkeit und Entfernen der Kämmen wurde der Behälter in eine mit TBE-Puffer aufgefüllte Gelelektrophoresekammer gehängt. Jeweils 4 µl der Amplifikat-Proben wurden nach Mischung mit je 1 µl 6 x Auftragspuffer und Farbindikator Bromphenolblau und 1 µl Aqua bidest. in die Geltaschen pipettiert. Nach Anlegen einer Spannung von anfangs 50 V für 15 min und anschließend 80 V für weitere 45 min konnten die Amplifikate im Gel aufgetrennt und als Banden unter dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und somit mit einer Sofortbild-Polaroidkamera unter Vorschaltung eines Rotfilters abfotografiert werden.

2.3.3.4 Reinigung des PCR-Amplifikats

Um auf dem SSCP-Gel, das mit einem Teil der restlichen 16 µl des DNA-Amplifikats durchgeführt wird, beste Ergebnisse zu erzielen, wurden die Proben von allen im PCR-Produkt vorliegenden nicht-abgetrennten Primern, Salzen, freien Nukleotiden und thermostabilen Polymerasen über einen Filter mit zwei Lagen Glasvlies gereinigt. Die Reinigung erfolgte anhand des High Pure PCR Product Purification Kit von der Firma Boehringer nach Anleitung.

Hierbei wurden zu den restlichen 16 µl PCR-Reaktionsansatz 150 µl des im Kit enthaltenen Bindungspuffers gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Nachdem das vorliegende Gemisch in das spezielle High Pure Filtrationsgefäß, das auf ein Auffanggefäß gesteckt wurde, gegeben wurde, folgte eine etwa 30 sec lange Zentrifugation bei 12000 x g in der Tischzentrifuge. Nach Verwerfen des Durchlaufs aus dem Auffanggefäß, wurde der Vorgang nach Zugabe von 500 µl des mitgelieferten Waschpuffers wiederholt. Anschließend wurde nochmal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Nach Aufstecken des Filtrationsgefäßes auf ein 1.5 ml-Eppendorfgefäß wurden 50 µl Elutionspuffer aus dem

Kit auf den Filter pipettiert. Nach Zentrifugation für 30 sec befanden sich insgesamt 50 µl aufgereinigtes PCR-Amplifikat im Eppendorfgefäß und konnten für das SSCP-Gel verwendet werden.

2.3.4 Visualisierung der Ergebnisse

2.3.4.1 SSCP-Gel

Die SSCP-Analyse (*Single-Strand Conformational Polymorphism*) eignet sich sehr gut, um Basensubstitutionen, also Polymorphismen, in kurzen DNA-Fragmenten nachzuweisen. Dem Verfahren liegt zugrunde, dass einzelsträngige DNA-Moleküle unterschiedlicher Sequenzen unterschiedliche Konformationen beziehungsweise Sekundärstrukturen einnehmen und deshalb auf einem nativen Polyacrylamidgel ein unterschiedliches Laufverhalten aufweisen. Entscheidend ist dabei die Tatsache, dass es sich um ein natives Polyacrylamidgel handelt, da die Auftrennung der einzelsträngigen Moleküle durch ein denaturierendes Gel lediglich nach der Größe und nicht nach der Sequenz erfolgen würde. Auch ein Erhitzen des Gels hätte eine DNA-Denaturierung zur Folge und muss deshalb vermieden werden. Die durch das Polyacrylamidgel aufgetrennten Moleküle lassen sich mit Hilfe der Silberfärbung sichtbar machen.

Um die SSCP-Analyse durchführen zu können, müssen die DNA-Amplifikate, die mittels PCR produziert wurden, denaturiert werden. Dazu werden 5 µl des gereinigten Amplifikats mit 5 µl deionisiertem Formamid versetzt, bei 95 °C für 5 min erhitzt und anschließend sofort in Eiswasser abgekühlt, um eine Renaturierung zu verhindern.

Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgt in einer Multiphor II Elektrophoreseinheit, auf die ein horizontales 8%iges Polyacrylamidgel (130 x 125 x 0,5mm) und zwei 2%ige Agarosepufferstreifen aufgebracht sind. Es werden jeweils 8µl der denaturierten Amplifikate auf kleine Auftragsfilterplättchen pipettiert.

Benötigtes Material und Herstellung des Polyacrylamidgels:

3 ml Tris-Sulfat-Puffer (200 ml Stammlösung besteht aus 140ml Aqua dest., 0.43 ml H₂SO₄, ca. 9 g Tris zur Einstellung des pH auf 9.0)

4 ml 29.1% Acrylamid - 0.9% Piperazindiacrylamid

5.5 µl Temed (Tetramethyl-Ethylendiamin)

105 µl APS 10%

8 ml Aqua bidest.

Die entsprechenden Mengen an Aqua bidest., Tris-Sulfat-Puffer, Acrylamid-Piperazindiacrylamid und Temed werden in eine kleinen Wulf'sche Flasche gegeben. Diese wird luftdicht verschlossen und die Flüssigkeit mittels Wasserstrahlpumpe für 5 min entgast. Mit dieser Entgasung werden kleinste Luftbläschen aus der Flüssigkeit entfernt und somit entsteht ein besonders homogenes und luftblasenfreies Gel. Anschließend wird Aminoperoxydisulfat (APS) zugegeben und die Flüssigkeit wird mit Hilfe einer 20ml Spritze mit aufgesetzter Kanüle vertikal zwischen die Trägerfolie (*Gel bond*) und Glasplatte in die vorgesehenen Einfüllstellen der vorbereiteten Gelkassette gespritzt. Die Gelkassette besteht aus zwei Glasplatten, die luftdicht mittels Klammern aufeinandergepresst werden. Auf die angefeuchtete Innenseite einer Platte wird der zukünftige Gelträger fest aufgewalzt und die flüssige Polyacrylamidlösung eingefüllt. Nach ca. einer Stunde hat sich das Gel durch Polymerisation verfestigt und kann vorsichtig von der Glasplatte der Gelkassette gelöst werden. Anschließend wird das Gel in zwei Hälften geteilt. Das Gel lässt sich im Kühlschrank bei 4 °C etwa drei Wochen konservieren. Dazu wird es mit Parafilm bedeckt und eingeschweißt.

Benötigtes Material und Herstellung der Agaroseplugs:

250 ml 0.5 M Tris-Borat-Puffer (Borsäure 0.14 M)

5 g Agarose High EEO research grade

0.01% Bromphenolblaulösung (je nach Schalengröße so viel, dass Agarosegel bedeckt ist)

Die Agarose wird durch Aufkochen in 250 ml Tris-Borat-Puffer gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wird die flüssige Agaroselösung in eine Kunststoffschale gegossen (ca. 5 – 8 mm hoch). Das Agarosegel wird nach Erstarren in 1 cm breite Streifen geschnitten und bedeckend mit 0.01% Bromphenolblaulösung (in Tris-Borat-Puffer) begossen. Die Streifen werden bei 2 – 8 °C gelagert.

Auf die Kühlplatte der Elektrophoresekammer wird etwas destilliertes Wasser gegeben und das Gel mit der Folienseite möglichst luftblasenfrei aufgebracht. Dabei ist zu beachten, dass das Gel parallel zum aufgedruckten Gitternetz der Keramikplatte gelegt wird, damit die DNA-Moleküle möglichst gerade durch das Gel laufen.

An das obere und untere Ende des Gels wird jeweils ein in Tris-Borat-Puffer und 0.01% Bromphenolblau getränkter, 1 cm breiter Agarosestreifen gelegt. Die Streifen werden genau parallel ausgerichtet und auf Gelbreite zugeschnitten.

In ca. 1 cm Abstand vom Ende des Gels, welches zur Kathode gerichtet ist, werden 5 x 5 mm große Fließpapierplättchen eng nebeneinander platziert. Dabei ist zu beachten, dass sich die Plättchen nicht berühren, da die aufgetragenen Proben sonst diffundieren können und somit kein eindeutig nachvollziehbares Ergebnis erreicht wird.

Auf die Plättchen werden 8 µl der denaturierten Proben und auf zwei je 8 µl eines 20 bp-beziehungsweise 100 bp-Größenstandards (undenaturiert) aufgetragen.

Die Elektrophorese wird bei 1000 V, 15 mA, 15 W und 10 °C in einer Multiphor II Electrophoresis Unit 2117 und Power support 2197 durchgeführt, bis die Bromphenolblau-bande fast die Anode erreicht hat (ca. 30 min). Anschließend lassen sich die aufgetrennten Banden durch Silberfärbung sichtbar machen.

2.3.4.2 Silberfärbung

Alle folgenden Vorgänge werden auf einem Laborschüttler durchgeführt. Die Fixierung erfolgt für 10 min in 10% Ethanol/ 0.5% Essigsäure. Anschließend wird das Gel einmal kurz für 5 sec und dann für 5 min in H₂O dest. gewaschen. Dann wird das Gel mit 0.1% AgNO₃ für 10 min gefärbt. Daraufhin erfolgt nochmals ein Waschen in H₂O dest. für 2 x 5 sec, um alle überflüssigen Silberionen zu entfernen. Die Entwicklung wird für maximal 20 min in einer Lösung mit 1.5% NaOH/ 0.015% NaBH₄/ 0.6% Formaldehyd (37%) durchgeführt. Gestoppt wird dieser Vorgang durch Schwenken des Gels für 1 min in 0.75% Na₂CO₃ oder H₂O.

2.3.4.3 Auswertung der SSCP-Gele

Am Gel lassen sich drei verschiedene Genotypen unterscheiden. Anhand der unterschiedlichen Bandenmuster lassen sich die einzelnen Genotyp „QQ“, „RQ“ und „RR“ sicher differenzieren (siehe Abbildung 10, Seite 49). Eine exemplarische Darstellung der verschiedenen möglichen Genotypen mit Standardleitern auf einem vollständigen SSCP-Gel findet sich in der Abbildung 11, Seite 61.

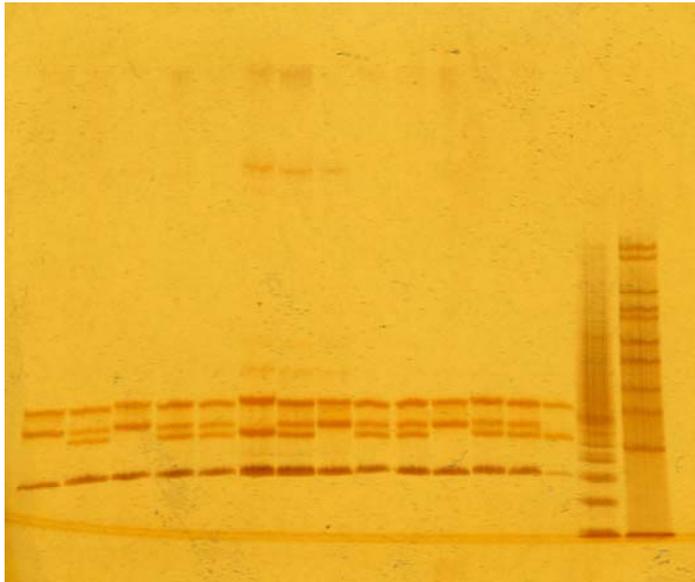
3 Ergebnisse

Der Schwerpunkt der Untersuchung liegt auf der Hypothese, dass Personen, die den IL-4-Rezeptorpolymorphismus tragen („RR“ oder „RQ“), ein anderes Erkrankungsmuster aufweisen als Personen ohne die Genveränderung. Augenmerk wurde hierbei auf das Erkrankungsalter, einen Geschlechtsunterschied, die Größe der Ausbreitung auf der Hautoberfläche, den Serumalbuminspiegel und die benötigte Glukokortikoiddosis bei Entlassung gelegt.

3.1 Exemplarische Darstellung der Ergebnisse der SSCP-Gel-Auswertung

In der Abbildung 11 (Seite 61) ist exemplarisch die Genotypisierung mit den drei unterschiedlichen Genotypen auf dem *Single-Strand Conformational Polymorphism-* (SSCP)-Gel anhand der DNA-Proben 1 bis 14 und ebenfalls die Standardleiter als Maßstab dargestellt.

Auf der 1., 3., 8. und 11. Spur findet sich der homozygote Genotyp QQ. Die heterozygote Konstellation RQ ist auf der 2., 4., 5., 7., 9., 10., 12. und 13. Spur abgebildet. Spur 6 und 14 zeigt den homozygoten Typ RR. Der 20 bp- bzw. 100 bp-Standardleiter ist auf Spur 15 beziehungsweise 16 dargestellt.



Spuren: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

Abbildung 11: SSCP-Gel mit 14 Proben (Patienten 1 - 14) der Amplifikate des IL-4-Rezeptorpolymorphismus Q576R und 2 Standardleitern (Spur 15: 20 bp-Leiter und Spur 16: 100 bp-Leiter). Die Nummern der einzelnen Spuren sind unterhalb des abgebildeten Gels aufgetragen. Die optische Darstellung der Einzelstrang-DNA erfolgt durch Silberfärbung.

3.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz, das sich mit Genhäufigkeiten und Verteilung der Allele in einer Population befasst, gilt: $p + q = 1$ [124]. Dieses bedeutet, dass die Häufigkeit für die Frequenz „R“ (p) + die Frequenz „Q“ (q) = 1, sprich 100%, ergibt. Sind die Genotypen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, so gilt: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Anhand dieser Formel lassen sich die Einzelwahrscheinlichkeiten, beziehungsweise Häufigkeiten der drei Genotypen „RR“, „RQ“ und „QQ“ im vorliegenden Kollektiv errechnen.

Untersucht man die BSD-Kontrollen (ohne gesunde Kontrollen), so wird eine Häufigkeit für das Ereignis „RR“ von 0.0256, 2.6%, erreicht. „RQ“ tritt mit einer Häufigkeit von 0.2688, entsprechend 26.9%, auf. Die Berechnung für „QQ“ ergibt 0.7056, 70.6%.

Berechnet man die Häufigkeiten für die gesunden Kontrollen, so ergeben sich sehr ähnliche Werte, wie bei den Gesamtzahlen aller untersuchten Personen: „RR“ 0.0361 beziehungsweise 3.6%, „RQ“ 0.3078, also 30.8% und „QQ“ 0.6561, sowie 65.6%.

Bei den Patienten mit BP beträgt die Einzelwahrscheinlichkeit für „RR“ $= 0.21^2 = 0.0441$, also 4.4%. „RQ“ tritt mit $2 * (0.21 * 0.79) = 0.3318$, sprich 33.2% Wahrscheinlichkeit auf. Die Häufigkeit des Genotyps „QQ“ ist $0.79^2 = 0.6241$, also 62.4%. Die Addition der Einzelwahrscheinlichkeiten ergibt erwartungsgemäß 1 beziehungsweise 100%. Kleine Abweichungen sind auf unwesentliche Rundungsfehler zurückzuführen.

Bei der Gruppe der PV-Patienten sind die Häufigkeiten identisch mit denen der BP-Patienten, da die Allel-Frequenzen sehr ähnlich sind (siehe Tabelle 5, Seite 62).

	gesamt n (%)	QQ (%)	RQ (%)	RR (%)
BSD-Kontrollen	73 (100%)	0.7056 (70.6%)	0.2388 (26.9%)	0.0256 (2.6%)
gesunde Kontr.	135 (100%)	0.6561 (65.6%)	0.3078 (30.8%)	0.0361 (3.6%)
BP	123 (100%)	0.6241 (62.4%)	0.3318 (33.2%)	0.0441 (4.4%)
PV	31 (100%)	0.6241 (62.4%)	0.3318 (33.2%)	0.0441 (4.4%)
Gesamt	362 (100%)	0.6561 (65.6%)	0.3078 (30.8%)	0.0361 (3.6%)

Tabelle 5: Häufigkeiten der Einzelereignisse aller untersuchten Individuen (n = 362), errechnet nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz. Die Werte sind in Dezimalzahlen entsprechend der Häufigkeiten der Einzelereignisse (QQ, RQ, RR) und in Klammern in Prozent, bezogen auf die jeweilige Anzahl n, angegeben.

In einer Aufstellung der Einzelwahrscheinlichkeiten bei den erfassten Patienten ergibt sich ein geringer Unterschied bei den PV-Patienten im Vergleich zu den BSD-Kontrollen. Hier liegt die Häufigkeit von „RR“ bei 6.8% vs. 4.4% in der Tabelle 6 (Seite 63). Ähnliches gilt für die Kontrollgruppe, bei der „RR“ mit 4.4% etwas häufiger erscheint als in Tabelle 5 (3.6%) (Seite 62). Insgesamt betrachtet sind die Differenzen zwischen gesunden Individuen und erfassten Patienten in den einzelnen Gruppen nicht signifikant und damit die Gruppen vergleichbar.

	gesamt n (%)	QQ (%)	RQ (%)	RR (%)
BSD-Kontrollen	19 (100%)	0.6241 (62.4%)	0.3318 (33.2%)	0.0441 (4.4%)
BP	69 (100%)	0.6400 (64.0%)	0.3200 (33.0%)	0.0400 (4.0%)
PV	21 (100%)	0.5476 (54.8%)	0.3848 (38.5%)	0.0676 (6.8%)
Gesamt	109 (100%)	0.6084 (60.8%)	0.3432 (34.3%)	0.0484 (4.8%)

Tabelle 6: Häufigkeiten der Einzelereignisse der erfassten Patienten (n = 109), errechnet nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz. Die Werte sind in Dezimalzahlen entsprechend der Häufigkeiten der Einzelereignisse (QQ, RQ, RR) und in Klammern in Prozent, bezogen auf die jeweilige Anzahl n, angegeben.

3.3 Allelverteilung des Studienkollektivs

Alle DNA-Proben wurden auf die Verteilung der Allele des IL-4-Rezeptor-Polymorphismus hin untersucht. Hierbei wurden die SSCP-Gele hinsichtlich der Genotypen ausgewertet und diese getrennt für PV und BP ausgewertet und zusammengefasst.

3.3.1 Allelverteilung des IL-4-Rezeptorpolymorphismus Q576R aller untersuchten Personen

In der Tabelle 7 (Seite 64) sind alle 362 untersuchten Personen in die einzelnen Gruppen aufgliedert und nach den im Experiment nachgewiesenen Allelkombinationen aufgeteilt. Gleichzeitig sind die einzelnen Frequenzen für „R“ beziehungsweise „Q“ dargestellt. Diese wurden folgendermaßen errechnet: $[(\text{Anzahl RR}) * 2 + \text{Anzahl RQ}] / (\text{Anzahl gesamt}) * 2 = \text{Frequenz R}$. Analog für Q beziehungsweise die anderen Kollektivgruppen.

Rechenbeispiel für die BP-Patienten:

$$(1 * 2 + 50) / (123 * 2) = 0.21 = \text{Frequenz R}$$

$$(72 * 2 + 50) / (123 * 2) = 0.79 = \text{Frequenz Q}$$

	gesamt n (%)	QQ (%)	RQ (%)	RR (%)	Frequ. Q	Frequ. R
BP	123 (100%)	72 (58.5%)	50 (40.7%)	1 (0.8%)	0.79	0.21
PV	31 (100%)	19 (61.3%)	11 (35.5%)	1 (3.2%)	0.79	0.21
Kontrollen	73 (100%)	52 (71.2%)	18 (24.7%)	3 (4.1%)	0.84	0.16
Kontroll-Stud.	135 (100%)	86 (63.7%)	46 (34.1%)	3 (2.2%)	0.81	0.19
Ges.zahl	362 (100%)	229 (63.3%)	125 (34.5%)	8 (2.2%)	0.81	0.19

Tabelle 7: Allelverteilung aller untersuchten Personen. Die Zahlen beziehen sich auf die Anzahl n der betreffenden Personen und in Klammern sind Prozentzahlen angegeben. Im rechten Teil der Tabelle (rot) sind die Frequenzhäufigkeiten für Q und R abgedruckt (Allelfrequenzen). In der Tabelle erkennt man die Tendenz, dass die Allelfrequenz „R“ bei den an BP oder PV erkrankten Personen häufiger vorkommt (0.21 vs. 0.16 bzw. 0.19).

Wenn man die Allelverteilung der einzelnen Gruppen betrachtet, fällt auf, dass die Kombination „RR“, also eine Homozygotie für das seltene Allel sehr rar ist. Im Vergleich zu „RQ“ und „QQ“ liegen die Prozentangaben in jeder der untersuchten Gruppen unter 5%.

Hinsichtlich der in Prozent angegebenen einzelnen Allelkonstellationen erscheint „RR“ in der Kontrollgruppe sogar am häufigsten vertreten zu sein, gefolgt von der „RR“-Gruppe der PV-Patienten.

Allerdings zeigt ein Vergleich der Frequenzhäufigkeiten für das Allel „R“ beziehungsweise „Q“ ein anderes Ergebnis. „R“ scheint in den Gruppen der erkrankten Personen mit einem Wert von 0.21 tendenziell häufiger zu sein, als in den Kontrollgruppen (0.16 beziehungsweise 0.19) (siehe Tabelle 7, Seite 64). Daley et al. haben in einer Studie von 2001 bei gesunden Kontrollen für das Allel R576 eine Frequenz von 17.9% angegeben [67]. Dies entspricht in etwa der Allelfrequenz der Kontrollgruppe der vorliegenden Studie (19%) und auch den Ergebnissen weiterer Untersuchungen für gesunde Personen (20%) [112].

3.3.2 Allelverteilung der erfassten BP- und PV-Patienten

In Tabelle 8 (Seite 65) sind die Allelverteilungen nach Genzählung dargestellt. Nur Personen aus der BSD-Datenbank wurden berücksichtigt.

	gesamt n (%)	QQ (%)	RQ (%)	RR (%)	Frequ. Q	Frequ. R
BP	69 (100%)	42 (60.9%)	26 (37.7%)	1 (1.4%)	0.80	0.20
PV	21 (100%)	11 (52.4%)	9 (42.8%)	1 (4.8%)	0.74	0.26
Kontrollen	19 (100%)	12 (63.1%)	6 (31.6%)	1 (5.3%)	0.79	0.21
Gesamtzahl	109 (100%)	65 (59.6%)	41 (37.6%)	3 (2.8%)	0.78	0.22

Tabelle 8: Kollektivgruppen nach Allelen und Allelfrequenzen der erfassten Patienten und gesunden Individuen. Die Zahlen beziehen sich auf die Anzahl n der betreffenden Personen und in Klammern sind Prozentzahlen angegeben. Im rechten Teil der Tabelle (rot) sind die Frequenzhäufigkeiten für Q und R abgedruckt. Hier ist die Allelfrequenz für „R“ bei den an PV-Erkrankten häufiger als bei den Kontrollen (0.26 vs. 0.21), bei BP ist sie dafür tendenziell seltener (0.20 vs. 0.21).

Tabelle 8 zeigt die Häufigkeiten der Allelfrequenzen bei PV im Vergleich zu den Kontrollen auf der Seite des seltenen Alleles „R“ zu liegen (0.26 vs. 0.21).

Bei den BP-Patienten scheint das Allel „R“ sogar in geringem Maße seltener zu sein als bei Gesunden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass selbst die geringen Unterschiede in den Frequenzhäufigkeiten für „R“ oder „Q“ keine Signifikanz aufweisen, sondern nur als Tendenzen zu interpretieren sind.

3.4 Untersuchung der Genotyp- und Allelfrequenzen des IL-4-Rezeptorpolymorphismus Q576R im Vergleich zu relevanten Kriterien aus dem BSD-Fragebogen

Im Hinblick auf die funktionellen Besonderheiten des IL-4-Rezeptors im Zusammenspiel mit IL-4 als Liganden beziehungsweise deren immunregulatorische Bedeutung wurde der Polymorphismus Gln576Arg mit epidemiologischen Kriterien wie Alter bei Erkrankung, das Geschlecht, das Vorliegen einer Schleimhautbeteiligung, die Ausdehnung der Blasen auf der Körperoberfläche, Höhe des Serumalbumins und die Glukokortikoiddosis bei Entlassung untersucht. Damit sollte ein Zusammenhang des Il-4-Rezeptorpolymorphismus Q576R zu Risikofaktoren hinsichtlich Auftreten und Schwere der bullösen Autoimmunerkrankung getroffen werden.

3.4.1 Alter bei Erkrankung

Das erste der untersuchten Kriterien war das Alter bei Beginn der Erkrankung. Hierbei sind nur die BP- und PV-Erkrankten relevant, da das Erkrankungsalter der Kontrollen hier nicht vergleichbar ist. Diese fehlende Relevanz begründet sich in der Tatsache, dass die Kontrollpatienten vereinbarungsgemäß unter einer akuten, nicht-autoimmunen Erkrankung leiden müssen. Das Erkrankungsalter der Kontrollpatienten ist daher nicht zu bewerten, da zum Beispiel Frakturen, akute Augenerkrankungen oder akute nicht-autoimmune dermatologische Erkrankungen nicht in die Hypothese, mit dem IL-4-Rezeptorpolymorphismus zu korrelieren, aufgenommen wurden und somit keine Aussage hinsichtlich eines früheren Erkrankungsrisikos getroffen werden kann.

3.4.1.1 Alter bei Ersterkrankung der BP-Patienten

Das bullöse Pemphigoid ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters [188, 243]. Ein Assoziation des Genotyps „RQ“ oder „RR“ mit einem früheren Krankheitsausbruch würde zum Beispiel für ein größeres Erkrankungsrisiko in jüngeren Jahren sprechen. Es sollte somit der Genotyp des IL-4-Rezeptors als Risikofaktor für einen frühen Erkrankungseintritt untersucht werden.

Die BP-Patienten wurden in vier Altersgruppen aufgeteilt (< 60 Jahre, 61 - 70 Jahre, 71 - 80 Jahre, > 81 Jahre). Diese Gruppen wurden gegen die bekannten Allelkombinationen aufgetragen (siehe Tabelle 9, Seite 67). Bei BP zeigt sich eine diskrete Tendenz zum früheren Krankheitsausbruch bei Patienten, die ein Allel „R“ tragen. Hier sind 50% der im Alter < 60 Jahren Erkrankten genotypisch „QQ“ und auch 50% genotypisch „RQ“. Die Verteilung bei den 71 - 80-Jährigen und > 81-Jährigen entspricht in etwa der Genotypverteilung der Kontrollen. Die QQ-Allele sind hier zu etwa 60% vertreten, die „RQ“-Allele meist zu 40%. „RR“ findet sich in der Regel zwischen 0% und maximal 5%. Dagegen erscheint bei den 61 - 70-jährigen Ersterkrankten sogar der Genotyp „QQ“ gehäuft vorzukommen (70.59% bei „QQ“ vs. 29.41% bei „RQ“ vs. 0% bei „RR“).

	gesamt n (%)	QQ (%)	RQ (%)	RR (%)	Frequ. Q	Frequ. R
< 60 J.	8 (100%)	4 (50%)	4 (50%)	0 (0%)	0.75	0.25
61 - 70 J.	17 (100%)	12 (70.6%)	5 (29.4%)	0 (0.0%)	0.85	0.15
71 - 80 J.	18 (100%)	11 (61.1%)	7 (38.9%)	0 (0.0%)	0.81	0.19
> 81 J.	26 (100%)	15 (57.7%)	10 (38.5%)	1 (3.8%)	0.77	0.23
Total	69 (100%)	42 (60.9%)	26 (37.7%)	1 (1.4%)	0.80	0.20

Tabelle 9: Ersterkrankungsalter der BP-Patienten aufgeteilt in die Genotypgruppen und Allelfrequenzen. Die verschiedenen Erkrankungsalter sind in mehrere Bereiche aufgeteilt (< 60 Jahre, 61 - 70 Jahre, 71 - 80 Jahren, > 81 Jahre). Die Zahlen beziehen sich auf die Anzahl n der betreffenden Personen und in Klammern sind Prozentzahlen angegeben. Der Genotyp „RQ“ scheint hier häufiger bei Patienten unter 60 Jahren und über 71 Jahren vorzuliegen.

3.4.1.2 Alter bei Ersterkrankung der PV-Patienten

Bei den PV-Patienten erscheint aufgrund des eheren Eintretens der Erkrankung als bei BP eine Unterteilung in < 40-Jährige, 41 - 60-Jährige und > 61-Jährige als sinnvoll. Die Frage war, ob bei „R“-Trägern häufiger ein früherer Erkrankungsbeginn vorliegt. Der PV-typische Altersgipfel liegt im mittleren Lebensalter. Das typische Erkrankungsalter wird zwischen 40 und 60 Jahren angegeben [42].

Wenn man nun versucht, den Genotyp mit den einzelnen Altersgruppen zu vergleichen, fällt auf, dass bei den < 40-jährigen Patienten eine leichte Häufung beim Genotyp „RQ“ zu verzeichnen ist. Dagegen sind bei den > 61-Jährigen mehr „QQ“-Allele zu finden. Bei den 41 - 61 Jahre alten Personen ist eine geringe Tendenz zur Häufung der Homozygotie für „RR“ zu erkennen (11.1%) (siehe Tabelle 10, Seite 68).

	gesamt n (%)	QQ (%)	RQ (%)	RR (%)	Frequ. Q	Frequ. R
< 40 J.	4 (100%)	0 (0.0%)	4 (100%)	0 (0.0%)	0.50	0.50
41 - 60 J.	9 (100%)	5 (55.6%)	3 (33.3%)	1 (11.1%)	0.72	0.28
> 61 J.	8 (100%)	6 (75%)	2 (25%)	0 (0.0%)	0.88	0.12
Total	21 (100%)	11 (52.3%)	9 (42.9%)	1 (4.8%)	0.74	0.26

Tabelle 10: Ersterkrankungsalter der PV-Patienten aufgeteilt in die Genotypgruppen und Allelfrequenzen. Die verschiedenen Erkrankungsalter sind in mehrere Bereiche aufgeteilt (< 40 Jahre, 41 - 60 Jahre, > 61 Jahre). Die Zahlen beziehen sich auf die Anzahl n der betreffenden Personen und in Klammern sind Prozentzahlen angegeben. Hier zeigt sich eine Häufung des Allels R bei den Patienten unter 40 Jahren mit dem Genotyp „RQ“.

3.4.2 Geschlechtsverteilung

Der in der vorliegenden Studie untersuchte IL-4-Rezeptorpolymorphismus wird autosomal vererbt. Daher müssten Männer und Frauen eine ähnliche Verteilung des seltenen Allels aufweisen.

Hier wurde ausgewertet, wie sich die Verteilung der Allele bezüglich des Geschlechts verhält. Interessant ist hierbei, wie sich die unterschiedlichen Genotypen innerhalb der einzelnen Gruppen (BP, PV, Kontrollen) verteilen. Ein Vergleich zwischen den Patienten und den Kontrollen ist nicht aussagekräftig, da in der Literatur sehr unterschiedliche Meinungen zur Inzidenz hinsichtlich der Geschlechtsverteilung existieren [235].

Von den insgesamt 227 untersuchten DNA-Proben war bei 6 Proben das Geschlecht der Patienten nicht bekannt, da die Proben geblindet eingesandt wurden. Daher können sie in die folgende Auswertung nicht eingehen.

3.4.2.1.1 Geschlechtsverteilung der BSD-Kontrollen

In der Tabelle 11 (Seite 69) ist die Genotypverteilung nach Geschlecht bei den BSD-Kontrollen dargestellt. Von insgesamt 69 untersuchten BSD-Kontrollen waren 28 männlich. Davon waren 19 (67.8%) homozygot für das häufige Allel („QQ“), 8 (28.6%) heterozygot („RQ“) und 1 Individuum (3.6%) homozygot für das seltenere Allel („RR“). Bei den 41 weiblichen Kontrollpatientinnen waren 30 (73.1%) homozygot für den Wildtyp, 9

(22.0%) heterozygot und 2 (4.9%) homozygot für den Polymorphismus. Die Werte sind vergleichbar ähnlich. Das Ergebnis entspricht der Erwartung, dass bei einer autosomalen Vererbungsform kaum Unterschiede bestehen dürften. Es zeigt sich allerdings eine geringe Tendenz dahingehend, dass mehr Männer heterozygot („RQ“) sind.

Die Gruppe der erfassten männlichen Personen (n = 3) teilt sich in 1 „QQ“ (33.3%), 2 „RQ“ (66.7%) und 0 „RR“. Bei den per Fragebogen aufgenommenen Frauen (n = 17), die sich als Kontrollen zur Verfügung gestellt haben, tragen 12 (70.6%) „QQ“, 4 „RQ“ (23.5%) und 1 „RR“ (5.9%).

	QQ	RQ	RR	Frequ. Q	Frequ. R
weibl. BSD-Kontrollen (n = 41)	30 (73.1%)	9 (22.0%)	2 (4.9%)	0.84	0.16
weibl. erf. BSD-Kontr. (n = 17)	12 (70.6%)	4 (23.5%)	1 (5.9%)	0.83	0.17
männl. BSD-Kontrollen (n = 28)	19 (67.8%)	8 (28.6%)	1 (3.6%)	0.82	0.18
männl. erf. BSD-Kontr. (n = 3)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	0 (0.0%)	0.67	0.33

Tabelle 11: Geschlechtsverteilung und Allelfrequenzen der BSD-Kontrollen. In der ersten und dritten Zeile sind alle BSD-Kontrollen nach Allelen aufgeteilt. In der zweiten und vierten Zeile sind nur die mit BSD-Fragebogen erfassten Personen (erf. BSD-Kontr.) aufgeführt. Die Zahlen vor den Klammern zeigen die Anzahl n, in Klammern sind die Prozentanteile angegeben. Hierbei ergibt sich, dass bei den männlichen Personen der Typ „RQ“, bei den weiblichen dagegen relativ gesehen der Genotyp „RR“ häufiger vorkommt.

Hier unterscheiden sich die Ergebnisse aller untersuchten Personen von denen der mit Fragebogen Erfassten. Bei den Frauen sind die Zahlen ähnlich wie bei den PV-Patienten („QQ“ ca. 72%, „RQ“ ca. 23%). Die Gruppe der erfassten männlichen Personen lässt sich aufgrund der kleinen Fallzahl (n = 3) hinsichtlich Signifikanz oder Tendenz nicht zuverlässig bewerten. Bei allen untersuchten männlichen Kontrollen ist die Verteilung ähnlich der normalen Gln576Arg-Verteilung oder sogar leicht in Richtung „QQ“ verschoben.

3.4.2.1.2 Geschlechtsverteilung der BP-Patienten

Betrachtet man die Allelverteilung hinsichtlich des Geschlechts der BP-Patienten, so ergeben sich folgende Ergebnisse (siehe Tabelle 12, Seite 70). Die männlichen BP-Patienten (n = 47) tragen zu 51.1% der Genotyp „QQ“ (n = 24), zu 48.9% „RQ“ (n = 23) und zu 0.0% „RR“ (n = 0). Bei den BP-Patientinnen (n = 76) haben 63.2% (n = 48) „QQ“, 35.5% (n = 27) „RQ“ und 1.3% „RR“ (n = 1).

Von 24 untersuchten und per Fragebogen der BSD-Studiengruppe erfassten männlichen BP-Patienten haben 54.2% (n = 13) „QQ“ und 45.8% (n = 11) „RQ“. „RR“ ist nicht vorhanden. Dagegen sind bei den weiblichen 64.5% (n = 29) der 45 untersuchten BP-Patientinnen „QQ“-Träger, 33.3% (n = 15) haben „RQ“ und 2.2% (n = 1) „RR“.

	QQ	RQ	RR	Frequ. Q	Frequ. R
weibl. BP-Patienten (n = 76)	48 (63.2%)	27 (35.5%)	1 (1.3%)	0.81	0.19
weibl. erf. BP-Pat. (n = 45)	29 (64.5%)	15 (33.3%)	1 (2.2%)	0.81	0.19
männl. BP-Patienten (n = 47)	24 (51.1%)	23 (48.9%)	0 (0.0%)	0.76	0.24
männl. erf. BP-Pat. (n = 24)	13 (54.2%)	11 (45.8%)	0 (0.0%)	0.77	0.23

Tabelle 12: Geschlechtsverteilung und Allelfrequenzen der BP-Patienten. In der ersten und dritten Zeile sind alle Patienten nach Allelen aufgeteilt. In der zweiten und vierten Zeile sind nur die mit BSD-Fragebogen erfassten Personen (erf. BP-Pat.) aufgeführt. Die Zahlen vor den Klammern zeigen die Anzahl n, in Klammern sind die Prozentanteile angegeben. Auch hier ist relativ gesehen bei den Männern der Genotyp „RQ“ häufiger, bei den Frauen jedoch „RR“.

Es fällt auf, dass sowohl bei allen untersuchten Personen als auch nur beim Kollektiv der erfassten Patienten ein geringer Geschlechtsunterschied besteht. Die Genotypverteilung der Frauen scheint mit etwa 63.5%, etwa 34.5% und etwa 2% der normalen Allelverteilung beim Gln576Arg-Polymorphismus zu entsprechen (vergleiche Tabelle 7, Seite 64 und Tabelle 8, Seite 65). Dagegen ist die Verteilung bei den Männern jeweils in Richtung „RQ“ verschoben. Hier tragen nur rund 53% „QQ“ und dafür rund 47% „RQ“. Der Genotyp „RR“ konnte nicht gefunden werden.

3.4.2.1.3 Geschlechtsverteilung der PV-Patienten

Betrachtet man die Geschlechtsverteilung der PV-Patienten, so ergeben sich folgende Zahlen (siehe Tabelle 13, Seite 71). Es wurden 12 männliche PV-Patienten untersucht. Hierbei hatten 5 (41.7%) den Genotyp „QQ“, 6 (50.0%) „RQ“ und 1 (8.3%) „RR“. Bei den Frauen wurden 17 PV-Erkrankte untersucht. 13 (76.5%) hatten „QQ“, 4 (23.5%) „RQ“ und 0 „RR“.

Von 10 untersuchten männlichen PV-Patienten, die mit Fragebogen erfasst waren, hatten 30.0% „QQ“ (n = 3), 60.0% „RQ“ (n = 6) und 10.0% „RR“. Die scheinbar hohe Zahl in der Gruppe „RR“ ergibt sich durch die kleine Fallzahl (n = 1) und ist in diesem Fall nicht signifikant. 27.3% (n = 3) der weiblichen PV-Patientinnen (n = 11) hatten „RQ“ und 72.7% „QQ“ (n = 8). Der Genotyp „RR“ wurde nicht gefunden. Hierbei ergibt sich zwar ein geringer Unterschied, aber durch die kleinen Fallzahlen ist dieser nicht weiter interpretierbar.

	QQ	RQ	RR	Frequ. Q	Frequ. R
weibl. PV-Patienten (n = 17)	13 (76.5%)	4 (23.5%)	0 (0.0%)	0.88	0.12
weibl. erf. PV-Pat. (n = 11)	8 (72.7%)	3 (27.3%)	0 (0.0%)	0.86	0.14
männl. PV-Patienten (n = 12)	5 (41.7%)	6 (50.0%)	1 (8.3%)	0.66	0.33
männl. erf. PV-Pat. (n = 10)	3 (30.3%)	6 (60.0%)	1 (10.0%)	0.65	0.35

Tabelle 13: Geschlechtsverteilung und Allelfrequenzen der PV-Patienten. In der ersten und dritten Zeile sind alle Patienten nach Alleltypen aufgeteilt. In der zweiten und vierten Zeile sind nur die mit BSD-Fragebogen erfassten Personen (erf. PV-Pat.) aufgeführt. Die Zahlen vor den Klammern zeigen die Anzahl n, in Klammern sind die Prozentanteile angegeben. Hier zeigt sich sowohl beim Genotyp „RQ“ wie auch „RR“ eine relative Häufung bei den männlichen Patienten.

Sucht man hier nach einem Geschlechtsunterschied, so fallen wieder Differenzen auf. Analog zu den BP-Patienten (siehe Tabelle 12) scheinen die männlichen PV-Erkrankten ebenfalls häufiger das seltenere Allel zu tragen. Man muss hierbei allerdings ergänzend hinzufügen, dass die Fallzahlen in der Gruppe PV relativ klein sind und auch deswegen Unterschiede auftreten können.

3.4.3 Schleimhautbeteiligung

Bei der Auswertung nach den folgenden Kriterien (Schleimhautbeteiligung, Größe der Hautausdehnung, Serumalbuminspiegel und Glukokortikoiddosis bei Entlassung) konnte nur auf die spezifischen Daten der mit Fragebogen erfassten Personen zurückgegriffen werden, so dass im Folgenden nur diese in die Statistik mit eingehen.

Ein Kriterium, das als *Severity*-Kriterium gewertet werden kann, ist das Vorliegen einer Schleimhautbeteiligung. Hierzu zählen sowohl Lokalisationen an Wangen- oder Rachen-schleimhaut, Gingiva, Schleimhäuten der Augen oder Genitalschleimhaut. In Tabelle 14 (Seite 72) und Tabelle 15 (Seite 73) sind die Allelgruppen in drei Kategorien aufgliedert: ja = Schleimhautbeteiligung, nein = keine Schleimhautbeteiligung, unbek. = unbekannt.

3.4.3.1 Schleimhautbeteiligung der BP-Patienten

Beim BP liegt nur in etwa 25% eine Schleimhautbeteiligung vor. Daher könnte das Vorliegen einer Schleimhautbeteiligung auf einen schwereren Krankheitsverlauf hinweisen.

Wenn man die Verteilung der einzelnen Kategorien ansieht (Tabelle 14, Seite 72), fällt auf, dass Patienten mit Schleimhautbeteiligung (Feld „ja“) das Allel „R“ („RQ“ oder „RR“) häufiger tragen als Patienten ohne Beteiligung der Schleimhaut (Feld „nein“). Die Verschiebung ist nach dem χ^2 -Test statistisch nicht signifikant (4.35), der Wertevergleich zeigt aber dennoch einen Trend.

	gesamt n (%)	QQ (%)	RQ (%)	RR (%)	Frequ. Q	Frequ. R
ja	12 (100%)	7 (58.33%)	4 (33.33%)	1 (8.33%)	0.75	0.25
nein	51 (100%)	31 (60.8%)	20 (39.2%)	0 (0.0%)	0.80	0.20
unbek.	6 (100%)	4 (66.7%)	2 (33.3%)	0 (0.0%)	0.83	0.17

Tabelle 14: Schleimhautbeteiligung nach Allelen und Allelfrequenzen beim BP. Eine Schleimhautbeteiligung ist mit „ja“, keine Schleimhautbeteiligung mit „nein“ bezeichnet. Bei 6 Patienten war nicht bekannt, ob eine Beteiligung der Schleimhaut vorlag (unbek.). Die Zahlen beziehen sich auf die Anzahl n der betreffenden Personen und in Klammern sind Prozentzahlen angegeben. Insgesamt gesehen ist sind Allelfrequenzen mit „R“ (33.3 % bei „RQ“ sowie 8.33% bei „RR“) häufiger, wenn eine Schleimhautbeteiligung vorliegt.

3.4.3.2 Schleimhautbeteiligung der PV-Patienten

Beim PV liegt in der Regel eine initiale Beteiligung der Schleimhaut, meist Mundschleimhaut, vor [188, 245]. Hier ist vor allem die Rachen- und Wangenschleimhaut sowie die Gingiva betroffen. Eine Erkrankung der Schleimhaut ist beim PV nicht außergewöhnlich und somit nicht als Risikokriterium für einen schwereren Krankheitsverlauf zu werten. Dennoch wurde in der Tabelle 15 (Seite 73) eine Übersicht über die Schleimhautbeteiligung beim PV nach Allelen geordnet aufgestellt.

In der Tabelle 15 (Seite 73) zeigt sich die entsprechende Verteilung: 2 Patienten haben zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Schleimhautbeteiligung, wohingegen 14 Patienten darunter leiden. Bei 5 Patienten war beim Aufnahmetag die Schleimhautbeteiligung nicht bekannt beziehungsweise nicht sicher zu bestätigen.

Betrachtet man die Prozentzahlen, so erscheinen diese sowohl bei „ja“ als auch „nein“ in Richtung der seltenen, veränderten Genotypen zu tendieren. 42.9% der Patienten mit Schleimhautbeteiligung tragen „RQ“, 7.1% den Genotyp „RR“. Dagegen haben 50.0% mit „RQ“ und 0.0% „RR“ keine Schleimhautbeteiligung. Eine Signifikanz ist aber auch hier nicht nachweisbar (χ^2 -Test: 0.16).

	gesamt n (%)	QQ (%)	RQ (%)	RR (%)	Frequ. Q	Frequ. R
ja	14 (100%)	7 (50.0%)	6 (42.9%)	1 (7.1%)	0.71	0.29
nein	2 (100%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	0 (0.0%)	0.75	0.25
unbek.	5 (100%)	3 (60.0%)	2 (40.0%)	0 (0.0%)	0.80	0.20

Tabelle 15: Schleimhautbeteiligung nach Allelen und Allelfrequenzen beim PV. Eine vorliegende Schleimhautbeteiligung ist mit „ja“, keine Schleimhautbeteiligung mit „nein“ bezeichnet. War nicht bekannt, ob eine Beteiligung der Schleimhaut vorlag, findet sich „unbekannt“ (unbek.). Die Zahlen beziehen sich auf die Anzahl n der betreffenden Personen und in Klammern sind Prozentzahlen angegeben. Hier sind die Genotyphäufigkeiten ausgeglichen, wobei der Typ „RR“ lediglich bei vorliegender Schleimhautbeteiligung vorkommt.

3.4.4 Ausdehnung der Hautbeteiligung

Neben der Schleimhautbeteiligung als *Severity*-Kriterium lag das Augenmerk auch auf der Ausbreitung der Hautbeteiligung. Hierbei wurden bei der Fragebogenaufnahme die Ausdehnung der Hautbeteiligung in vier Kategorien aufgeteilt: Hautbeteiligung < 10%, zwi-

schen 10 - 50%, > 50% oder „unbekannt“. Es sollte die Hypothese geprüft werden, dass eine ausgedehntere Hautbeteiligung bei Patienten mit „R“ im Genotyp auf eine Assoziation mit einer schwereren Erkrankungsform und eventuell auch schlechteren Prognose hinweisen könne. Insofern wäre das Wissen über den Genotyp hinsichtlich der Therapie und Prognose wichtig.

3.4.4.1 Maximale Ausdehnung der Hautbeteiligung bei BP-Patienten

Bei den Patienten mit einer Hautbeteiligung < 10% fällt eine Tendenz in Richtung seltenem Allel „R“ auf (siehe Tabelle 16, Seite 74). Der Wildtyp „QQ“ tritt zu 50.0% auf und auch der Genotyp „RQ“ findet sich in 50.0%, wobei „RR“ hier fehlt. In der Gruppe der Patienten mit einer Ausdehnung der Hautbeteiligung von 10 - 50% ist die Verteilung entsprechend der normalen Genotypverteilung (63.1% bei „QQ“, 34.2% bei „RQ“ und 2.6% bei „RR“). Von einer überdurchschnittlich großen Hautbeteiligung (> 50%) scheinen mehr BP-Patienten mit dem Genotyp „QQ“ (72.7%) betroffen zu sein, als Patienten mit „RQ“ (27.3%). Patienten mit „RR“ finden sich in dieser Gruppe nicht.

Bei 6 Patienten war die Verteilung der Blasen und Erosionen an der Hautoberfläche im Datensatz des Fragebogens nicht erfasst.

	gesamt n (%)	QQ (%)	RQ (%)	RR (%)	Frequ. Q	Frequ. R
< 10%	14 (100%)	7 (50.0%)	7 (50.0%)	0 (0.0%)	0.75	0.25
10 - 50%	38 (100%)	24 (63.2%)	13 (34.2%)	1 (2.6%)	0.83	0.17
> 50%	11 (100%)	8 (72.7%)	3 (27.3%)	0 (0.0%)	0.86	0.14
unbek.	6 (100%)	3 (50.0%)	3 (50.0%)	0 (0.0%)	0.75	0.25

Tabelle 16: Maximale Hautbeteiligung und Allelfrequenzen der BP-Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung. Das Ausmaß der maximalen Hautbeteiligung ist in drei Kategorien (< 10%, 10 - 50% und > 50% betroffenes Hautareal) aufgeteilt. Die Zahlen beziehen sich auf die Anzahl n der betreffenden Personen und in Klammern sind Prozentzahlen angegeben. Der Genotyp „RQ“ ist hier vermehrt bei einer Hautbeteiligung unter 10% zu finden.

Nach dem χ^2 -Test liegt keine Signifikanz (2.21) dafür vor, dass bei BP-Patienten eine größere Hautoberfläche erkrankt ist.

3.4.4.2 Maximale Ausdehnung der Hautbeteiligung bei PV-Patienten

Bei den PV-Patienten sind die Ergebnisse bei der Assoziation der Größe der Hautbeteiligung mit dem Genotyp ähnlich (siehe Tabelle 17, Seite 75). 62.5% der PV-Patienten mit Hautbeteiligung unter 10% haben den Genotyp „QQ“ und 37.5% haben „RQ“. „RR“ liegt in dieser Gruppe nicht vor.

Im Feld „10 - 50%“ ist die Verteilung der PV-Gruppe ebenfalls der normalen Genotypverteilungen ähnlich (66.7% „QQ“, 33.3% „RQ“ und 0.0% „RR“).

Nur ein Patient hatte eine Hautbeteiligung bei PV von über 50% betroffene Fläche. Sein Genotyp war „QQ“.

Bei 9 Patienten war die Größe der Hautbeteiligung nicht oder nicht genau erfasst. Diese Patienten wurden in die Gruppe „unbekannt“ eingeteilt.

	gesamt n (%)	QQ	RQ	RR	Frequ. Q	Frequ. R
< 10%	8 (100%)	5 (62.5%)	3 (37.5%)	0 (0.0%)	0.81	0.19
10 - 50%	3 (100%)	2 (66.7%)	1 (33.3%)	0 (0.0%)	0.75	0.25
> 50%	1 (100%)	1 (100%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1.00	0.00
unbek.	9 (100%)	3 (33.3%)	5 (55.6%)	1 (11.1%)	0.61	0.39

Tabelle 17: Maximale betroffene Fläche und Allelfrequenzen der PV-Patienten. Das Ausmaß der maximalen Hautbeteiligung ist in drei Kategorien (< 10%, 10 - 50% und > 50% betroffenes Hautareal) aufgeteilt. Die Zahlen beziehen sich auf die Anzahl n der betreffenden Personen und in Klammern sind Prozentzahlen angegeben.

3.4.5 Serumalbumin

Die Höhe des Serumalbumins wurde ebenfalls auf eine Assoziation mit den polymorph veränderten Genotypen hin untersucht. In einigen Studien gibt es Hinweise dafür, dass ein niedriger Albuminserumspiegel als Marker für die Schwere einer Erkrankung und die Mortalitätswahrscheinlichkeit angesehen werden kann. So bringt Corti beispielsweise die Höhe des Albuminserumspiegels in Zusammenhang mit koronarer Herzerkrankung [63], für Piccoli dagegen ist sie *outcome marker* für Dialysepatienten [222]. Bei schweren Autoimmunerkrankungen kann die Leberfunktion mit beeinträchtigt und somit auch die Menge

des Albumins im Körper beeinflusst sein. Die Albuminserumspiegel stehen mit dem klinischen Zustand und der Hautbeteiligung bei BP und PV in Zusammenhang [166]. Savin et al. stellten fest, dass bei den PV-Patienten kurz vor deren Tod die Serumalbuminwerte erniedrigt waren [238]. Hierbei können ursächlich der direkte Verlust über die Hautläsionen oder auch die verminderte Nahrungsaufnahme aufgrund von Dysphagie bei Mundschleimhautbeteiligung neben der Lebersyntheseleistung maßgeblich beteiligt sein.

Es wurden die einzelnen Gruppen (BP, PV und Kontrollen) nach der Höhe des Albuminspiegels im Serum bewertet.

3.4.5.1 Serumalbuminspiegel bei Kontrollpatienten

Bei 12 der 19 BSD-Kontrollpatienten war der Serumalbuminspiegel erfasst (siehe auch Diagramm 5, Seite 77).

Hier findet sich bei 10 Kontrollpatienten der Genotyp „QQ“ (n = 10). Die Einheit der angegebenen Zahlen beträgt g/l. Mittelwert \pm SD (5%-Perzentile, 25%-Perzentile, Median, 75%-Perzentile, 95%-Perzentile) liegen in dieser Gruppe bei 42.0 ± 5.8 (31.0, 39.0, 42.5, 47.0, 50.0).

Bei den Patienten mit „RQ“ (n = 1) war nur bei einem Patienten die Albuminhöhe erfasst. Daher liegen Mittelwert, Median und Perzentilen bei 43.0 ± 0.0 .

Bei dem einen Kontrollpatienten mit „RR“ war der Serumalbuminspiegel bekannt. Mittelwert, Median und Perzentilen waren 37.0 ± 0.0 .

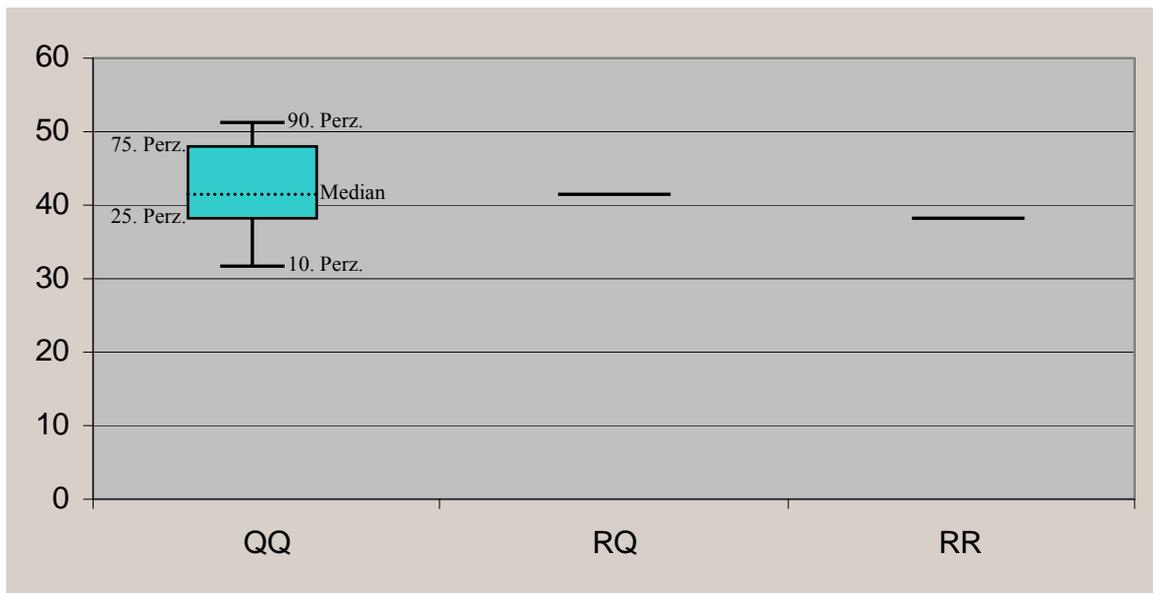


Diagramm 5: Höhe der Serumalbuminspiegel bei den Kontrollpatienten, dargestellt als Boxplot-Diagramm. Die Einteilung erfolgte nach Genotypen. Auf der linken Achse sind die Albuminspiegel in g/l aufgetragen. Am linken Boxplot sind exemplarisch die verschiedenen Linien bezeichnet (10., 25., 75., 90. Perzentile, Median). Der Median ist gestrichelt eingezeichnet. Median und Mittelwert liegen so dicht beieinander, dass keine unterschiedlichen Linien eingezeichnet werden können.

Insgesamt scheinen die Werte bei den Kontrollpatienten mit „QQ“ (42.0 ± 5.8) beziehungsweise „RQ“ (43.0 ± 0.0) ähnlich zu sein.

Allerdings können diese Ergebnisse nicht mit Sicherheit interpretiert werden, da die Fallzahlen teilweise sehr klein ($n < 5$) sind.

3.4.5.2 Serumalbuminspiegel bei BP-Patienten

Insgesamt war bei 50 der 69 erfassten BP-Patienten die Höhe des Albuminspiegels bekannt (siehe Diagramm 6, Seite 78). Bei den 32 Personen mit QQ liegt der Mittelwert \pm SD bei 39.4 ± 7.1 (29.0, 36.5, 39.0, 41.5, 54.0). Bei den BP-Patienten mit „RQ“ ($n = 18$) liegen die Serumalbuminwerte ähnlich: Mittelwert \pm SD 41.4 ± 8.3 (30.0, 34.0, 41.5, 47.0, 60.0). Bei dem einzigen typisierten BP-Patienten mit „RR“ lagen keine Daten zu der Albuminhöhe vor.

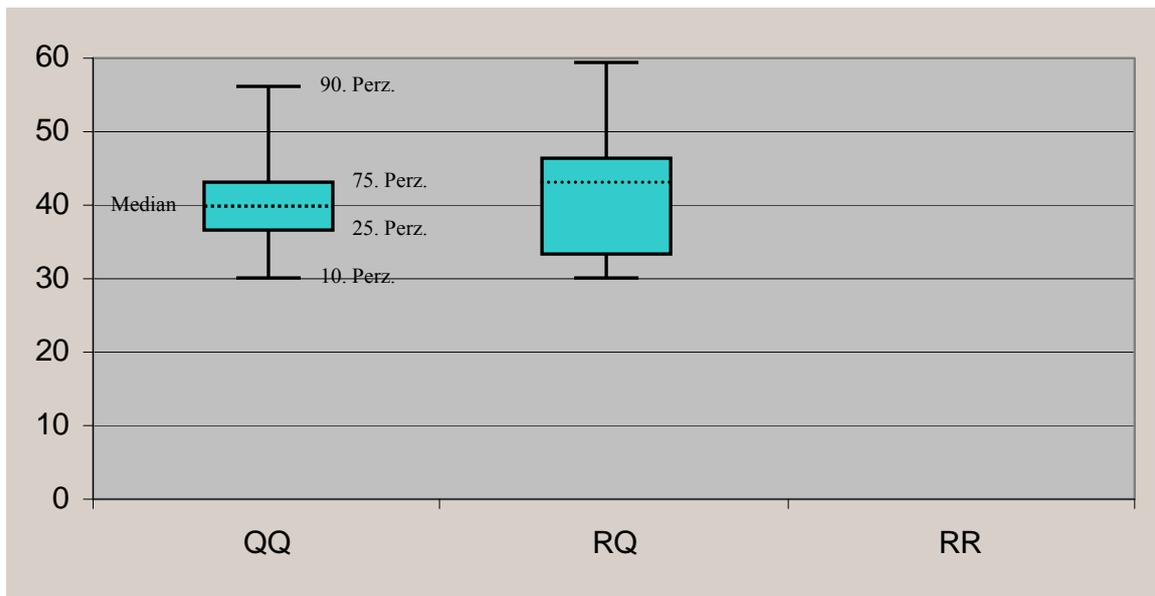


Diagramm 6: Höhe der Serumalbuminspiegel bei den BP-Patienten dargestellt als Boxplot-Diagramm. Die Einteilung erfolgte nach Genotypen. Auf der linken Achse sind die Albuminspiegel in g/l aufgetragen. Der Median ist gestrichelt eingezeichnet. Median und Mittelwert liegen so dicht beieinander, dass keine unterschiedlichen Linien eingezeichnet werden können.

Die Mittelwerte der beiden ausgewerteten Gruppen unterscheiden sich also kaum: 39.4 ± 7.1 („QQ“) vs. 41.4 ± 8.3 („RQ“).

3.4.5.3 Serumalbuminspiegel bei PV-Patienten

Bei 12 von den 21 erfassten und typisierten PV-Patienten war der Albuminspiegel bekannt. In der Gruppe der „QQ“-Patienten ($n = 9$) lag der Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) bei 36.6 ± 14.4 (6.0, 30.0, 41.0, 45.0, 53.0).

Ein gering höherer Mittelwert findet sich in der Gruppe „RQ“ ($n = 3$): 43.0 ± 2.6 (41.0, 41.0, 42.0, 46.0, 46.0).

Es lagen keine Daten zu dem typisierten PV-Patienten mit „RR“ vor. Siehe Tabelle 7, Seite 64.

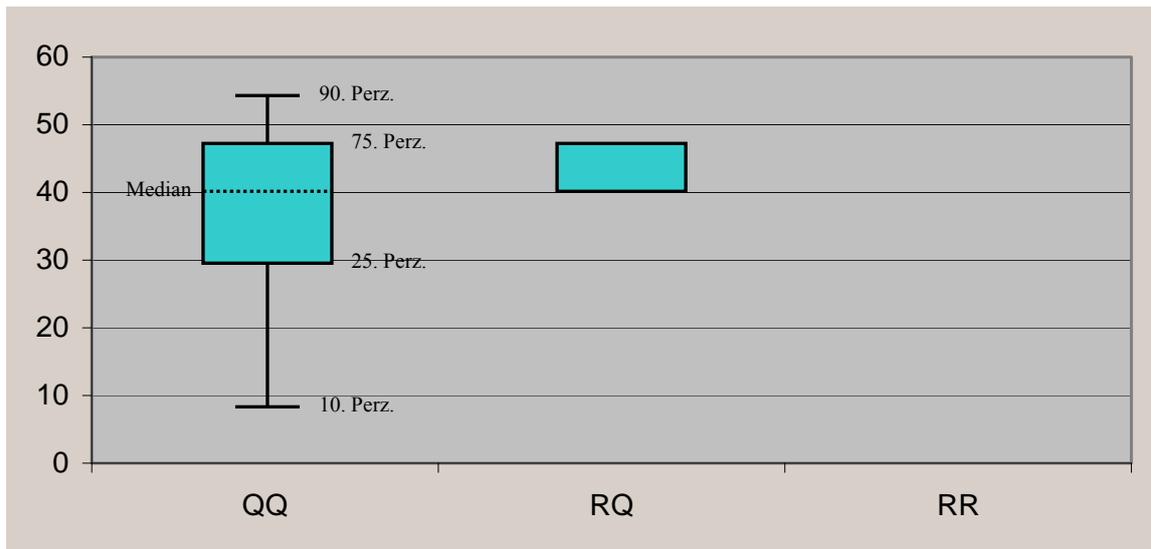


Diagramm 7: Höhe der Serumalbuminspiegel bei den PV-Patienten dargestellt als Boxplot-Diagramm. Die Einteilung erfolgte nach Genotypen. Auf der linken Achse sind die Albuminspiegel in g/l aufgetragen. Der Median ist gestrichelt eingezeichnet. Median und Mittelwert liegen so dicht beieinander, dass keine unterschiedlichen Linien eingezeichnet werden können. Im Boxplot „RQ“ liegt der Median zu nah an der Linie für die 25. Perzentile, so dass keine separate Linie eingezeichnet werden kann. Auch die Markierungen für die 10. und 90. Perzentile können nicht extra aufgetragen werden.

Der Mittelwert in der Gruppe „RQ“ erscheint geringfügig höher zu liegen (43.0 ± 2.6) als in der Gruppe „QQ“ (36.6 ± 14.4).

Der χ^2 -Test ergab beim Vergleich der Gruppe „QQ“ der Patienten ($n = 32$) vs. die Kontrollen ($n = 10$) einen Wert von 2.65.

Vergleicht man dagegen die Gruppe der „RQ“-Personen (BP-Patienten $n = 18$ vs. Kontrollen $n = 1$), so errechnet sich nach dem χ^2 -Test 0.0, da die Fallzahlen in diesem Feld zu klein sind.

Bei den PV-Patienten liegen die Signifikanztestwerte niedriger: PV ($n = 9$) vs. Kontrollen ($n = 10$) bei „QQ“ zeigt einen Wert von 0.38.

Bei den untersuchten Personen mit „RQ“ (PV $n = 3$ vs. Kontrollen $n = 1$) liegt der Wert des χ^2 -Tests bei 0.20.

3.4.6 Glukokortikoiddosis bei Entlassung

Als weiteres *Severity*-Kriterium erschien die Entlassungssteroiddosis ein sinnvolles Untersuchungsmerkmal zu sein. Glukokortikoide sind nach wie vor die wichtigsten Therapeuti-

ka bei den autoimmunbullösen Dermatosen [42]. Die Dosis der Glukokortikoidmedikation kann als guter Maßstab für die Schwere der Erkrankung gewertet werden [235].

Im Fragebogen der BSD-Gruppe wurden die Glukokortikoiddosen der Patienten in Methylprednisolonäquivalenten angegeben, um eine exakte Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

3.4.6.1 Glukokortikoiddosis bei Entlassung der Kontroll-Patienten

Die durchschnittliche Glukokortikoiddosis bei Entlassung wurde bei den Kontrollpatienten nicht untersucht, da aufgrund der unterschiedlichsten Erkrankungen nur sehr selten Glukokortikoide gegeben wurde.

3.4.6.2 Glukokortikoiddosis bei Entlassung bei BP-Patienten

Bei 57 der 69 erfassten BP-Patienten war die Glukokortikoiddosis bei Entlassung erfasst (siehe Diagramm 8, Seite 81).

33 dieser Patienten hatten den Genotyp „QQ“. Der Mittelwert \pm SD beträgt 25.2 ± 14.9 (4.0, 15.0, 25.0, 30.0, 60.0).

In der Gruppe „RQ“ lag bei 23 der Patienten der Mittelwert bei 24.5 ± 10.9 (10.0, 20.0, 25.0, 32.0, 40.0).

Bei dem einen BP-Patienten mit „RR“ war die Endsteroiddosis 5.0 ± 0.0 .

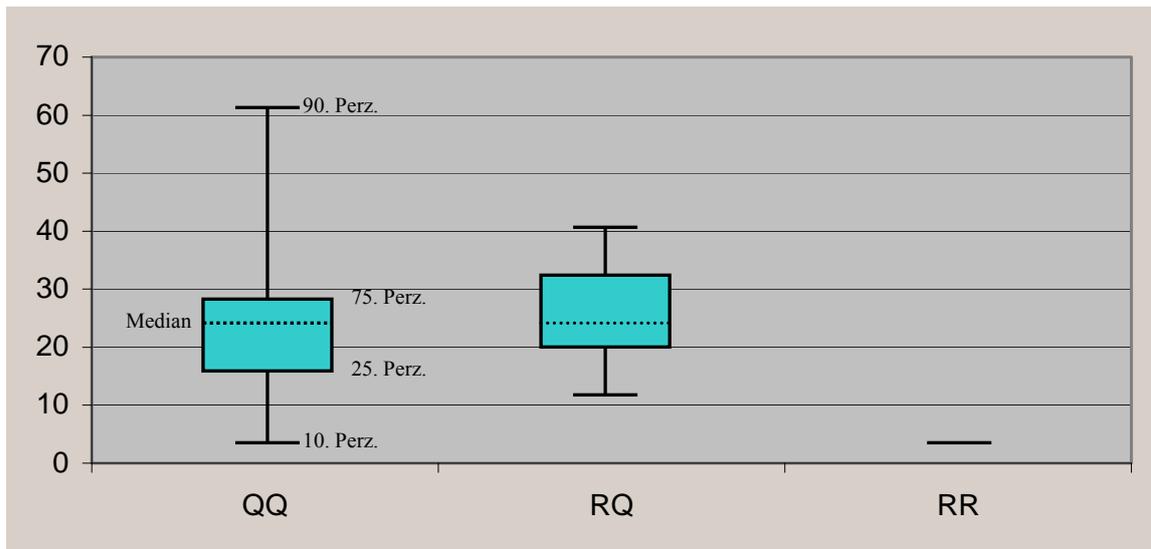


Diagramm 8: Darstellung der Glukokortikoiddosierungen der BP-Patienten bei Entlassung als Boxplot-Diagramm. Die Einteilung erfolgte nach Genotypen. Auf der linken Achse sind die Dosen der Glukokortikoide in mg aufgetragen. Am linken Boxplot sind exemplarisch die verschiedenen Linien bezeichnet (10., 25., 75., 90. Perzentile, Median). Der Median ist gestrichelt eingezeichnet. Median und Mittelwert liegen so dicht beieinander, dass keine unterschiedlichen Linien eingezeichnet werden können. Hier erscheint der Genotyp „RR“ sogar eine niedrigere Glukokortikoiddosis bei Entlassung nach sich zu ziehen.

Die Höhe der Glukokortikoiddosis bei Entlassung ist sowohl beim Genotyp „QQ“ als auch „RQ“ sehr ähnlich (25.2 ± 4.9 vs. 24.5 ± 10.9). Dem „RR“-Patienten wurde nach Entlassung eine auffällig niedrige Glukokortikoiddosis verordnet (5.0 ± 0.0).

Insgesamt ist die Interpretation ähnlich wie beim Serumalbuminspiegel schwierig, da die Fallzahlen wieder sehr klein sind.

3.4.6.3 Glukokortikoiddosis bei Entlassung bei PV-Patienten

17 der 21 PV-Patienten wurden im Fragebogen nach der Glukokortikoiddosis bei Entlassung gefragt (Diagramm 9, Seite 82).

8 Patienten hatten genotypisch „QQ“. Hier lag der Mittelwert \pm SD bei 36.3 ± 22.3 (5.0, 25.0, 32.5, 45.0, 80.0). Bei den PV-Patienten mit „RQ“ (n = 9) lag der Mittelwert bei 56.7 ± 33.5 (7.0, 38.0, 50.0, 75.0, 125.0). Der Mittelwert bei dem einzigen Patienten mit „RR“ lag bei 75.0 ± 0.0 .

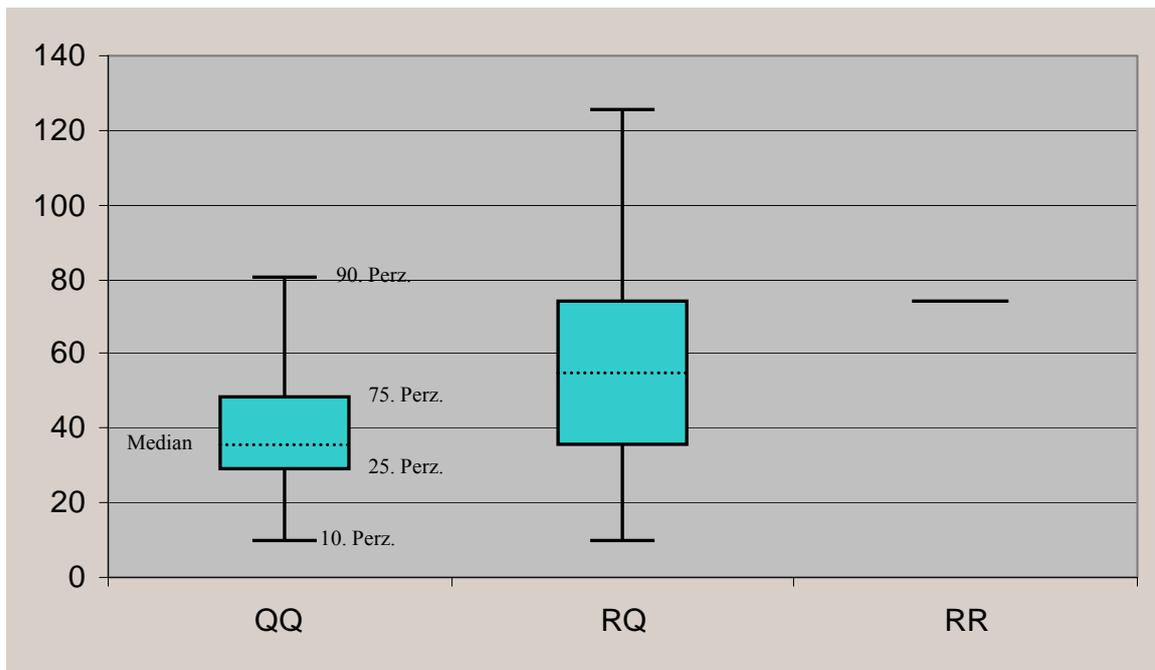


Diagramm 9: Darstellung der Glukokortikoiddosierungen der PV-Patienten bei Entlassung als Boxplot-Diagramm. Die Einteilung erfolgte nach Genotypen. Auf der linken Achse sind die Dosen der Glukokortikoide in mg aufgetragen. Der Median ist gestrichelt eingezeichnet. Median und Mittelwert liegen so dicht beieinander, dass keine unterschiedlichen Linien eingezeichnet werden können. In dieser Aufstellung zeichnet sich der Trend ab, dass der Genotyp „RR“ bei Entlassung eine höhere Glukokortikoiddosis nötig macht.

Die Glukokortikoiddosis bei Entlassung scheint bei den Patienten mit „R“, interpretierbar vor allem bei „RQ“, deutlich höher zu liegen (36.3 ± 22.3 vs. 56.7 ± 33.5 vs. 75.0 ± 0.0). Eine Signifikanz ist nicht zu errechnen, da die Bereiche (Mittelwert \pm Standardabweichung) überlappend sind. Beispiel: Mittelwert \pm SD bei „QQ“ zwischen 24 und 58.6 und bei „RQ“ zwischen 23.2 und 90.2. Ein statistischer Test ist bei Bereichsüberlappung nicht anwendbar.

4 Diskussion

4.1 Ergebnisdiskussion

4.1.1 Genotypverteilung der Kollektive

Um die bullösen Dermatosen als Th2-Erkrankung zu detektieren, müssen die Patienten und Kontrollen hinsichtlich der Genotypkonstellationen aufgeteilt werden. Wenn mehr BP-beziehungsweise PV-Patienten den Gln576Arg-Polymorphismus tragen, würde das dafür sprechen, dass die Erkrankungen stark vom Einfluss von IL-4 abhängig sind, da R576 eine erhöhte IL-4-Affinität nach sich zieht [280].

In einer Studie von Nieters et al. waren 60.4% der untersuchten Personen homozygot für „Q“, 30.6% waren heterozygot („RQ“) und 9.0% wiesen eine Homozygotie für den Polymorphismus auf („RR“) [201]. Diese Werte entsprechen in etwa denen der vorliegenden Untersuchung. Geringe Unterschiede im Bereich „RR“ (< 5.5% vs. 9%) sind vermutlich auf die relativ kleine Studiengröße der vorliegenden Untersuchung zurückzuführen.

Allerdings zeigen sich leichte Unterschiede in den einzelnen Kollektivgruppen. Wenn man nur die Zahlen für alle untersuchten Patienten betrachtet, so ergeben sich leicht andere Ergebnisse als bei den mit Fragebogen erfassten Personen.

Bei der Gruppe aller Patienten zeigen die Daten, dass prozentual sogar minimal mehr Kontroll- und PV-Patienten den Genotyp „RR“ haben (BP: 0.8%, PV: 3.2%, BSD-Kontrollen: 4.1%, gesunde Kontrollpersonen: 2.2%). Den Genotyp „RQ“ scheinen mehr bullös Erkrankte zu tragen (BP: 40.7%, PV: 35.5%, BSD-Kontrollen: 24.7%, gesunde Kontrollpersonen: 34.1%).

Betrachtet man die Frequenzen für die Allele „Q“ und „R“, so wird deutlich, dass die BP- und PV-Patienten für „R“ mit 0.21 leicht höher liegen als die Kontrollen (BSD-Kontrollen: 0.16 und gesunde Kontrollpersonen: 0.19).

Wenn man als Kollektiv nur die mit Fragebogen erfassten Personen untersucht, zeigen sich andere Ergebnisse. Prozentual gesehen, ergeben sich ähnliche Verhältnisse wie bei allen Untersuchten. Die Frequenzen für „R“ sind bei den BP-Patienten 0.20, bei den PV-Patienten 0.26, bei den BSD-Kontrollen 0.21 und bei den gesunden Kontrollpersonen 0.22.

Hier scheinen die erfassten PV-Patienten häufiger das Allel „R“ zu tragen, was sich bei der Betrachtung des Gesamtkollektivs nicht bestätigen lässt.

Die Zahl für „R“ liegt bei den gesunden Kontrollpersonen jeweils leicht höher als bei den BSD-Kontrollen. Man muss hierbei bedenken, dass das Durchschnittsalter dieser gesunden Kontrollpersonen weit unter dem der Kontrollen liegt, da das Kollektiv der Gesunden vorwiegend aus Studenten gebildet wurde. Das Alter der BSD-Kontrollen entspricht dagegen in etwa dem der Erkrankten. Bei den gesunden Kontrollpersonen kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass sie später an einer bullösen Dermatose erkranken. In einer Wiederholung der Studie mit den gleichen Personen, aber in mehreren Jahren würden die Ergebnisse eventuell anders aussehen und es könnte sich ein Risiko für BP oder PV bei Polymorphismusträgern abzeichnen.

4.1.2 Entstehungsalter

Da sich bei BP-Patienten mit dem Allel „R“ eine diskrete Tendenz zum früheren Krankheitsausbruch zeigt (50% < 60 Jahre), könnte man hier indirekt auf einen Einfluss des IL-4 schließen. Wie bereits erwähnt, wurde nachgewiesen, dass ein R576-veränderter IL-4-Rezeptor mit einer gesteigerten Affinität für IL-4 einhergeht [112, 280]. Da besonders in der Blasenflüssigkeit von BP-Patienten IL-4 gefunden wurde [224] und IL-4 bei der Aktivierung von B-Zellen und dem *Class-switching* von IgE zu IgG-Antikörpern [61, 88, 278] beteiligt ist, könnte ein Zusammenhang bestehen. IL-4 ist neben IgG1-Produktionsaktivierung auch für die Bildung von IgE-Antikörpern [58] verantwortlich und schafft sich damit indirekt die Grundlage für die IgG4-Antikörper. Beim BP ist die Bindung von Kollagen Typ XVII (BPAG 180) an IgG-Antikörper krankheitsauslösend und somit könnte IL-4 hierbei eine pathogenetisch entscheidende Rolle spielen. Es ist erwiesen, dass IgE selbst einen Beitrag bei der Immunantwort gegen BP230 leistet [71].

Bei den PV-Patienten mit dem Polymorphismus liegt eine Verschiebung im Entstehungsalter vor. Es scheint eine geringe Tendenz dahin zu gehen, dass die Patienten unter 60 Jahren und vor allem auch unter 40 Jahren gehäuft den Genotyp „RQ“ tragen. Allerdings sind hier die Fallzahlen sehr klein, so dass eine Beurteilung schwierig wird. Zu berücksichtigen ist hierbei auch, dass der Altersgipfel beim PV wesentlich niedriger liegt als beim BP und die Altersverteilung für die seltenen frühen Erkrankungsfälle wegen geringer Fallzahlen nur schwer beurteilbar ist.

Da bei PV-Erkrankten ebenfalls IL-4 in der Blasenflüssigkeit festgestellt werden konnte [224], ist auch bei dieser Erkrankung ein R576-Einfluss bei der Pathogenese denkbar. Die PV-Auto-Antikörper gehören neben IgG1 vor allem zur Untergruppe IgG4 [32, 33, 138], bei deren Produktion IL-4 einen entscheidenden Beitrag leistet.

Wenn eine Person durch einen Gln576Arg-Polymorphismus im Genmaterial vorbelastet ist, wäre es denkbar, dass es durch den oben beschriebenen pathophysiologischen Mechanismus früher zum Krankheitsausbruch kommt.

4.1.3 Geschlechtsverteilung

Bei allen männlichen BSD-Kontrollen liegen die Genotyphäufigkeiten für „QQ“ bei 67.8%, für „RQ“ bei 28.6% und für „RR“ bei 3.6%. Bei den männlichen Kontrollpersonen, die mit Fragebogen erfasst waren, trat „QQ“ zu 33.3%, „RQ“ zu 66.7% und „RR“ zu 0.0% auf. Alle untersuchten weiblichen BSD-Kontrollpersonen haben zu 73.1% „QQ“, zu 22.0% „RQ“ und zu 4.9% „RR“. Bei den weiblichen mittels Fragebogen erfassten Kontrollpersonen lassen sich die Häufigkeiten in 70.9% („QQ“), 23.5% („RQ“) und 5.9% („RR“) aufteilen.

Vergleicht man die Allelverteilung bei nach Geschlecht gruppierten Personen, so zeigt sich bei den erkrankten Personen ein Unterschied. Es fällt auf, dass männliche BP- und PV-Patienten scheinbar häufiger das Allel „R“ des IL-4-Rezeptorpolymorphismus tragen. Sowohl bei allen untersuchten Patienten als auch bei den mit Fragebogen Erfassten verhalten sich die Genotypverteilungen ähnlich. In der Gruppe „QQ“ liegen die Werte bei allen männlichen BP-Patienten bei 51.1%, bei den erfassten männlichen BP-Patienten bei 54.2%. Das Allel „RQ“ liegt bei 48.9% aller weiblicher BP-Patienten und bei 45.8% der erfassten erkrankten Frauen vor. Bei den Frauen entspricht die Verteilung dem Ergebnis der normalen Häufigkeiten für den R576-Polymorphismus.

Untersucht man die PV-Patienten, so zeigen die Zahlen einen ähnlichen Trend. Die männlichen Patienten tragen zu 30.0% (erfasst) beziehungsweise 41.7% (alle) den Genotyp „QQ“ und zu 60.0% (erfasst) beziehungsweise 50.0% (alle) „RQ“. Bei den weiblichen PV-Patientinnen zeigt sich sogar eine leichte Häufung von „QQ“. Es scheinen mehr homozygot gesund zu sein. 76.5% aller weiblicher PV-Patientinnen und 72.7% der erfassten tragen „QQ“. Der Genotyp „RQ“ findet sich zu 23.5% (alle) beziehungsweise zu 27.3% (erfasst) bei den Frauen, die an PV erkrankt sind.

Diese Ergebnisse sind zwar nicht signifikant, aber es veranlasste doch dazu, zu untersuchen, ob die männlichen Personen eventuell an einer anderen Th2-Erkrankung leiden oder irgendwelche anderen Besonderheiten haben. Hierzu schien eine ergänzende Fragebogenauswertung hinsichtlich Malignomkrankung, rheumatoider Arthritis, anderen Autoimmunerkrankungen, Rhinitis allergica, atopischem Ekzem und Asthma bronchiale sinnvoll. Eine sinnvolle statistische Auswertung in dieser Hinsicht war wegen sehr kleiner Fallzahlen nicht möglich.

4.1.4 Schleimhautbeteiligung

Beim BP ist eine Schleimhautbeteiligung sehr selten. Wenn man davon ausgeht, dass eine Erkrankung von Schleimhautarealen auf einen schwereren Krankheitsverlauf hindeutet, ist der Versuch auf eine Assoziation mit dem IL-4-Rezeptor-Polymorphismus zu untersuchen, relevant. In der Auswertung der Ergebnisse bei den BP-Patienten fällt eine Verschiebung bei der Genotypverteilung bei den Patienten auf, bei denen eine Schleimhautbeteiligung vorliegt. 33.33% haben in dieser Kategorie „RQ“, 8.33% „RR“ und nur 58.33% „QQ“. Aus diesen Daten, die zwar nicht signifikant, aber dennoch als Tendenz auffällig sind, lässt sich ableiten, dass möglicherweise ein Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und einer Schleimhautbeteiligung besteht. Da eine Beteiligung der Schleimhaut als *Severity*-Kriterium im Hinblick auf die Prognose wichtig ist, könnte ein umfassendes genetisches Untersuchungsprogramm möglicherweise nähere Informationen liefern. Hierbei wären zusätzliche Genveränderungen erfasst, die Einfluss auf die Prognose und Klinik der bullösen Dermatosen haben.

Beim PV ist in der Regel initial eine Schleimhautbeteiligung vorhanden. Ein nennenswerter Unterschied in den Daten hinsichtlich der Genotypen ist nicht zu sehen. Infolgedessen lässt sich dieses Kriterium nicht als Indikator für die Schwere der Erkrankung werten. Es wurde in der Literatur beschrieben, dass bei alleiniger Schleimhautbeteiligung bei Therapiebeginn die Erkrankungsform sogar leichter und das Mortalitätsrisiko geringer ist [195].

4.1.5 Größe der Hautbeteiligung

Als *Severity*-Kriterium wurde auch die maximale Hautausdehnung eingestuft.

Bei den BP-Patienten haben dem Ergebnis der Auswertung zufolge mehr Patienten mit „QQ“ (72.7%) eine erkrankte Hautoberfläche von über 50%. Bei einer Oberflächenbeteili-

gung von unter 10% scheinen mehr Patienten den Genotyp „RQ“ zu tragen. Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass kein Zusammenhang zwischen der Größe der Integumentfläche und der Erkrankungsschwere beziehungsweise dem Polymorphismus besteht.

Die Hautoberflächenbeteiligung der PV-Patienten lässt sich analog zu den BP-Patienten nicht mit dem Vorliegen der Genveränderung am IL-4-Polymorphismus in Verbindung bringen.

4.1.6 Serumalbuminspiegel

Savin hat in einer Studie 1979 festgestellt, dass ein erniedrigter Serumalbuminspiegel auf eine schlechtere Prognose hinweist [238]. Allerdings ist gerade oft bei alten Menschen, die einen Großteil der BP-Patienten ausmachen, wegen eingeschränkter Leberfunktion der Albuminspiegel im Serum erniedrigt. Diese Tatsache würde die prognostischen Erwartungen erheblich verfälschen.

In den vorliegenden Ergebnissen sind nur geringe Unterschiede hinsichtlich des Serumalbuminspiegels zu erkennen. Bei BP liegen die Werte bei 39.4 ± 7.1 für „QQ“ und bei 41.4 ± 8.3 für „RQ“. Für die Gruppe „RR“ liegen keine Zahlen vor. Für die PV-Patienten ergaben sich Ergebnisse von 36.6 ± 14.4 („QQ“) und 43.0 ± 2.6 („RQ“). Auch hier waren keine „RR“-Daten erfasst. In der Kontrollgruppe lagen die Werte für „QQ“ bei 42.0 ± 0.0 , für „RQ“ bei 43.0 ± 0.0 und bei „RR“ bei 37.0 ± 0.0 .

Vergleicht man die einzelnen Genotypen innerhalb der BP- beziehungsweise PV-Gruppe, so scheint sogar eher eine Erniedrigung des Albuminspiegels bei „QQ“-Patienten vorzuliegen. Mit dem Polymorphismus liegt kein nachweisbarer Zusammenhang vor, da die Ergebnisse nicht signifikant sind und eher eine Erniedrigung beim Genotyp „RQ“ auffallen müsste. Leider ist die Gruppengröße teilweise so klein ($n = 1$), dass die Interpretation schwierig wird. Insgesamt weicht der Spiegel aber nicht vom Normbereich 35 - 50 g/l ab. Es wäre grundsätzlich eine geringe Erniedrigung bei den prospektiv erfassten Patienten zu erwarten gewesen, da schwere Autoimmunerkrankungen mit verminderter Leberfunktion einhergehen. Hierbei wäre an einen Albuminverlust durch Mangelernährung infolge Schleimhautbeteiligung zu denken. Selbst über großflächige Läsionen könnte Albumin verloren gehen.

4.1.7 Glukokortikoiddosis bei Entlassung

Allerdings scheint die höhere Glukokortikoiddosis, die den PV-Patienten mit dem R576-Polymorphismus am Ende des stationären Aufenthalts vermehrt empfohlen wurde, dafür zu sprechen, dass die Erkrankung bei diesem Genotyp mit stärkerer Entzündungsreaktion einhergeht. Für den Gln576Arg-Polymorphismus wurde bereits in früheren Studien eine Assoziation zu entzündlichen Erkrankungen beschrieben [203, 210]. In diesem Zusammenhang erscheint ein Hinweis in Richtung Prognose interessant. Unter der Annahme, dass die initiale Dosis mit der Hautbeteiligung in Zusammenhang steht, haben Pemphiguspatienten, die initial weniger als 100 mg Prednisolonäquivalent benötigen, eine günstigere Prognose [259]. Im Umkehrschluss könnte das bedeuten, dass Patienten mit höherer Entlassungsdosis eventuell auch initial größere Mengen bekommen haben. Somit würde der Gln576Arg-Polymorphismus bei PV-Patienten, der hier einen Trend in Richtung höhere Glukokortikoiddosen zeigt, eventuell auf eine schlechtere Prognose hinweisen.

Bei dem einzigen PV-Patienten mit dem Genotyp „RR“ fällt eine deutlich erhöhte Entlassungsdosis auf. Der Patient bekam 75 mg Prednisolonäquivalent (Vergleich im Mittelwert: „QQ“ 36.3 und „RQ“ 56.7). Die Krankenakte des Patienten wurde nochmals genau studiert, um eine Erklärung für die hohe Glukokortikoiddosis zu finden. Es bestand der Verdacht, dass der Patient an einer anderen Grunderkrankung, die eine Glukokortikoidtherapie erfordert, oder einem malignen Geschehen leidet, was die erhöhte Dosis oder eine stärkere PV-Ausprägung erklären könnte. Aus dem Krankenblatt des Patienten war zu ersehen, dass beim Bruder des Patienten bereits ein PV bekannt war und deswegen beim Erkrankten schon initial eine hohe Glukokortikoiddosis (100 mg Methylprednisolonäquivalent) angesetzt wurde. Die hohe Entlassungsdosis des Patienten mit 75 mg Methylprednisolonäquivalent lässt sich dadurch erklären, dass er die Klinik auf eigenen Wunsch verfrüht und gegen ärztlichen Rat verlassen hat. Im weiteren Krankheitsverlauf konnte die Dosis bei gutem klinischen Bild auf eine Erhaltungsdosis von 5 beziehungsweise 2.5 mg Methylprednisolonäquivalent reduziert werden. Der initiale klinische Krankheitsverlauf war hinsichtlich der dokumentierten dermatographischen Daten nicht außerordentlich schwer. Somit erklärt sich die hohe Entlassungsteroiddosis einerseits aus der relativ hoch angesetzten Initialdosis wegen bekanntem PV beim Bruder und andererseits aus der Tatsache, dass der Patient verfrüht die Klinik verlassen hat. Ein Zusammenhang zum Polymorphismus scheint in diesem Zusammenhang unwahrscheinlich, kann aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Allerdings ist in der Gruppe „PV“ ein tendenzieller Unterschied hinsichtlich der Entlassungsdosis an Glukokortikoiden zwischen „QQ“ und „RQ“ zu erkennen. Da nur ein Patient mit „RR“ erfasst war, sollte ein Zusammenhang an einem größeren Kollektiv nochmals geprüft werden.

4.2 Diskussion des Studienaufbaus und der Statistik

4.2.1 Besonderheiten beim Studienaufbau

Eine Fall-Kontroll-Studie – ob modifiziert oder in klassischer Form – erfordert eine klare Definition von Fällen und Kontrollen. Allerdings besteht Anfälligkeit für Fehler (*Bias*).

Der durch den Fragebogen standardisierte Studienaufbau der vorliegenden Untersuchung als Fall-Kontroll-Studie ist modifiziert. So werden nicht bei jeder Auswertung eines bestimmten Kriteriums „Fälle“ mit „Kontrollen“ verglichen, sondern manchmal erscheint ein Vergleich zwischen den einzelnen Genotypgruppen sinnvoller. Beispielsweise ist es nicht sinnvoll, die Entlassungsdosis an Glukokortikoiden der Kontrollpersonen in der Auswertung zu berücksichtigen, da diese Patienten wegen der unterschiedlichsten Erkrankungen behandelt wurden und ein Vergleich hinsichtlich der Therapie und dem Genotyp unsinnig erscheint.

Ein Fehler, der auf der unterschiedlichen Qualität der Patientenangaben und deren Erinnerungsvermögen beruht, ist der Recall-Bias. Allerdings wurden in der vorliegenden Studie nur Kriterien aus dem Fragebogen berücksichtigt, die objektiv beurteilbar waren.

Hinsichtlich der diagnostischen Qualität der einzelnen Fragebogeninterviewer besteht natürlich ein gewisser diagnostischer Bias. Oftmals waren Doktoranden mit der Befragung beauftragt, die unter Umständen klinisch nicht sehr erfahren waren. Diese Tatsache könnte eine Fehlerquelle bergen. Um diesem diagnostischen Bias vorzubeugen, ist der Fragebogen einfach konzipiert und sehr hilfreich mit Hinweisen gestaltet (Fragebogenauszüge im Anhang). Selbst wenn diagnostische Fehler nicht gänzlich ausgeschlossen werden können, würden sie statistisch keine wesentlichen Konsequenzen haben, da die Studie multizentrisch angelegt war und nicht nur eine einzige Klinik und ein einziger Diagnostiker beteiligt war.

Signifikante systematische Fehler beim Interview mit den Patienten durch missverstandene Fragebogenfragen sind sehr unwahrscheinlich, da in verschiedenen Zentren auch mehrere unterschiedliche Interviewer für die Patientenaufnahme verantwortlich waren.

Eine weitere Schwierigkeit liegt möglicherweise darin, dass es sich bei der Studie um eine Querschnittstudie handelt. Hierbei ist zu bedenken, dass die Patienten nicht alle zur gleichen Zeit, sondern über einen längeren Zeitraum verteilt, per Fragebogen erfasst worden sind. Dadurch ist nicht immer eine exakte Vergleichbarkeit gewährleistet, da individuelle Unterschiede und Einflüsse bestehen. Allerdings dürften die ausgewählten Kriterien nicht von äußeren Einflüssen veränderbar sein.

4.2.2 Mögliche Fehlerquellen beim Experiment

Gerade im experimentellen Teil können Fehler auftreten, die die Studienergebnisse verfälschen können. Allerdings sind die Methoden (PCR, SSCP) der vorliegenden Studie relativ schnell zu erlernen und wurden sorgfältig und unter strengen hygienischen Bedingungen durchgeführt, um systematische Fehler und Verunreinigungen mit fremder DNA zu vermeiden.

Bei jedem PCR- und SSCP-Durchgang wurden DNA-Proben aus allen Personengruppen (BP-Patienten, PV-Patienten, Kontrollpersonen) gleichzeitig verwendet. Die Proben waren nicht nach Gruppen sortiert, sondern so nummeriert, dass anhand der Nummer nicht nachvollziehbar war, zu welcher Gruppe der jeweilige Patient gehört. Die Entnahme der Proben erfolgte nach dem Zufallsprinzip aus den Probenkästchen, um eine unbewusste Selektion auszuschließen.

Die Ergebnisse wurden kritisch ausgewertet und bei nicht eindeutigen Banden wurde der Versuch wiederholt.

Um die Ergebnisse zu plausibilisieren, wurde bei zufällig ausgewählten 18 der 227 DNA-Proben (7.9%) nochmals der Genotyp mittels PCR und SSCP bestimmt. Die Ergebnisse stimmten zu 100% mit den bereits Ermittelten überein. Die Genotypen der gesunden Kontrollpersonen sind hierbei nicht miteinbezogen, da die Daten dieses Kollektivs bereits überprüft waren.

Alle Versuchsdurchführungen und Laborarbeiten wurden konsequent und genau in einem Laborbuch protokolliert.

Da die SSCP-Gele nicht lange konservierbar sind und sich die Polyacrylamidschicht nach dem Trocknen leicht von der Trägerfolie ablöst, wurden die Gele kurz nach Fertigstellung mittels Scanner auf den PC übertragen und die Daten anschließend auf CD-Rom gespeichert.

4.2.3 Unvollständige Datenerhebung im Fragebogen

Die teilweise unvollständige Datenerhebung im Fragebogen und damit in der großen BSD-Datenbank bedingt eine Studieneinschränkung. Dies ist die Ursache dafür, dass die Studienstärke bei manchen Auswertungen leider reduziert ist.

4.2.4 Testbesonderheiten

4.2.4.1 Einschränkungen des χ^2 -Tests

Für die statistischen Auswertungen zur Untersuchung möglicher Assoziationen zwischen den Genotypen und den ausgewählten Kriterien wurde der χ^2 -Test angewendet. Hierbei ist aber der Hinweis unerlässlich, dass der Test teilweise nur unter Vorbehalt zu beurteilen ist. Der Grund dafür ist, dass es für manche Testgruppen (z. B. „RR“ und Altersgruppe „71-80“ bei BP-Patienten) keine Patienten gibt, sondern im Feld „0“ steht. Damit lässt sich mit diesem Test keine Signifikanz errechnen. Allerdings ist eine Ergänzung durch einen alternativen Test in dieser Studie nicht notwendig, da sich allein durch den bloßen Zahlenvergleich eine Signifikanz ausschließen lässt.

4.2.4.2 Testausschluss bei Ergebnisbesonderheiten

Bei manchen Ergebniskonstellationen ist eine Testanwendung nicht möglich. In diesen Zusammenhang gehören Zahlen mit bestimmten Streubereichen (Mittelwert \pm SD). Ein statistischer Test ist nicht durchführ- beziehungsweise auswertbar, wenn sich diese Bereiche bei zwei zu vergleichenden Gruppen überschneiden. Zur Verdeutlichung mag folgendes Beispiel dienen: Der Streubereich in der Gruppe „QQ“ bei BP-Patienten hinsichtlich des Serumalbuminspiegels liegt bei 39.4 ± 7.1 (also von 32.3 bis 46.5). Bei der „RQ“-Gruppe hierbei ist der Bereich bei 41.4 ± 8.3 (also von 33.8 bis 49.7). Die gemeinsame Schnittmenge, die oben als „überschneidend“ bezeichnet wurde und damit die Testinterpretation unmöglich macht, ist also von 33.8 bis 46.5.

5 Ergebniszusammenfassung und Ausblick

Die Vermutung, es könnte sich bei den bullösen Dermatosen um eine Th2-vermittelte Autoimmundermatose handeln, kann hinsichtlich des IL-4-Rezeptorpolymorphismus Q576R nicht bestätigt werden. Begründen lässt sich das damit, dass eine gesteigerte Rezeptoraktivität und damit größerer IL-4-Einfluss bei den untersuchten BP- beziehungsweise PV-Patienten nicht signifikant gezeigt werden konnte. Um das zu untersuchen, wurden nicht nur die Krankheitsgruppen nach Genotypkonstellationen in Verbindung gebracht, um ein eventuell erhöhtes Risiko für R576-Träger nachzuweisen. Die Korrelation von *Severity*-Kriterien, die als Indikatoren für die Krankheitsschwere dienen, mit dem Genotyp sollte weiteren Aufschluss über einen pathogenetischen Zusammenhang geben. Leider waren in beiden Untersuchungsschwerpunkten nur Tendenzen und keine signifikanten Ergebnisse zu verzeichnen. Möglicherweise spielt die geringe Studienstärke dabei eine Rolle und so sollten die Ergebnisse an einem größeren Kollektiv nochmals überprüft werden.

Falls sich in anderen Studien mit signifikanten Ergebnissen der Verdacht bestätigen sollte, dass IL-4 bei den bullösen Dermatosen BP und PV eine wesentliche Rolle spielt, sollte das Augenmerk auf neuen Therapiemöglichkeiten liegen. In der Literatur fand sich der interessante Hinweis, dass Acetylsalicylsäure (Aspirin®) im Gegensatz zu den nicht-steroidalen antientzündlichen Medikamenten wie Indomethazin oder Flurbiprofen in vitro selektiv die Sekretion von IL-4 und die RNA-Expression des IL-4-Gens in CD4⁺-Zellen hemmt [60]. Damit hätte Aspirin einen immunmodulierenden Effekt, der auch in der Therapie der IL-4-vermittelten pathologischen Immunreaktionen Erfolge versprechen und die Prognose verbessern könnte. Hinsichtlich der schweren Nebenwirkungen der Glukokortikoide und der immunsuppressiven Medikamente, die immer noch Mittel der Wahl bei den bullösen Dermatosen sind, aber sogar allein durch ihre Komplikationen die Lebenserwartung verkürzen können [29, 167, 232], erscheint die Suche nach Therapiealternativen ein wichtiges Ziel.

Hinsichtlich der Entwicklung eines umfassenden genetischen Untersuchungsprogramms, das auf die jeweilig Erkrankung hin konzipiert ist, erscheint es aber auch zukünftig sinnvoll, Polymorphismen und deren Einfluss bei BP- und PV-Patienten zu untersuchen. Möglicherweise finden sich andere Mutationen am IL-4-Gen, die Konsequenzen auf die Krankheitsentwicklung haben könnten. Natürlich sollten auch andere Zytokine und deren Rezeptoren untersucht werden. Mittels eines modifizierten Untersuchungsprogramms könnte

man schnell die Diagnose stellen und anhand des individuellen Polymorphismus-Musters des Patienten prognostische Aussagen treffen und entsprechend die Therapie abstimmen.

6 Zusammenfassung

In der Literatur finden sich Hinweise, dass es sich bei den bullösen Dermatosen um Autoimmunerkrankungen handelt, bei denen Th2-Zellen eine wesentliche Rolle spielen.

In den Blasenflüssigkeiten von BP- und PV-Patienten findet sich das Zytokin IL-4, dessen Sekretion in erster Linie von Th2-Zellen vermittelt wird. IL-4 ist für die Aktivierung von B-Zellen zuständig, die Antikörper der Klasse IgE und IgG1 produzieren. Zusätzlich ist das Zytokin für den Klassenwechsel von IgE zu IgG4 verantwortlich. Bei der Pathogenese von BP und PV spielen unter anderem Auto-Antikörper aus der Klasse IgG4 und IgE eine wesentliche Rolle. Es liegt also der Verdacht nahe, dass IL-4 eine wesentliche Aufgabe bei der Entstehung dieser bullösen Dermatosen hat. Darüberhinaus ist bekannt, dass der IL-4-Rezeptorpolymorphismus Gln576Arg mit einer gesteigerten Affinität des Rezeptors für IL-4 einhergeht.

In der vorliegenden Arbeit wurden in einer modifizierten Fall-Kontroll-Studie Patienten und Kontrollpersonen auf das Vorliegen dieses Rezeptorpolymorphismus hin untersucht. Desweiteren wurde versucht, die das Vorliegen der verschiedenen Genotypen mit klinischen Kriterien aus einem Fragebogeninterview zu assoziieren.

Das Ziel der Studie bestand darin, nachzuweisen, ob diese bullöse Dermatosen Th2-vermittelte Erkrankungen sind und inwieweit sich aus dem Vorliegen des Polymorphismus neue pathophysiologische Aspekte ergeben. Weiterführend sollte die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur Entwicklung eines diagnostischen Untersuchungsprogramms leisten, um mit Hilfe einer umfassenden DNA-Analyse diagnostische, prognostische und therapiespezifische Informationen zu erhalten, die letztlich dem Patienten zugutekommen könnten.

Um den Genotyp hinsichtlich des Gln576Arg-Polymorphismus zu bestimmen wurde aus den Blutproben der Patienten DNA isoliert. Mittels PCR wurde der Genabschnitt, auf dem sich der Polymorphismus befindet, amplifiziert und auf einem Agarosegel kontrolliert. Das entstandene Amplifikat wurde nach Aufreinigung auf einem SSCP-Gel aufgetrennt. Nach Silberfärbung zur Visualisierung der entstandenen Banden entstanden drei verschiedene Bandenkonstellationen für „homozygot QQ“, heterozygot „RQ“ und homozygot „RR“.

Die Auswertung der Allelverteilung in den einzelnen Kollektivgruppen ergab kein signifikant gehäuftes Vorliegen des R576 bei den Patienten mit den bullösen Dermatosen, aber eine geringe Tendenz in diese Richtung. Genauso zeigte die Datenauswertung einen Trend dahin, dass die Patienten mit dem Allel „R“ früher an einer bullösen Dermatosen erkrank-

ken. Bei der Auswertung fiel ein Geschlechtsunterschied auf. In den Gruppen der Erkrankten tragen männliche Patienten häufiger den Polymorphismus.

Aus dem Fragebogeninterview wurden zur Korrelation Kriterien wie Schleimhautbeteiligung, maximale Hautausdehnung, Serumalbuminspiegel und Entlassungssteroiddosis gewählt. Hiermit wurde versucht, Aussagen zur Schwere der Erkrankung (*severity*-Kriterien) zu treffen. Es fiel dabei auf, dass ein tendenzieller Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und einer Schleimhautbeteiligung bei BP-Patienten besteht. Die Größe der Hautbeteiligung konnte nicht mit dem Gln576Arg-Polymorphismus assoziiert werden. Bei der Datenauswertung im Hinblick auf den Serumalbuminspiegel, der auch als prognostischer Faktor eine Rolle spielen könnte, konnten keine auffälligen Unterschiede gefunden werden. Abschließend wurde ein Vergleich mit der Glukokortikoiddosis bei Entlassung gezogen. Hier fiel auf, dass bei den PV-Patienten mit „R“ höhere Dosen von Glukokortikoiden nach Krankenhausentlassung empfohlen wurden. Möglicherweise litten diese Patienten unter stärkerer Entzündungsreaktion oder schwererem Krankheitsverlauf.

Anhand der erarbeiteten Auswertungsergebnisse konnten die bullösen Dermatosen BP und PV nicht zweifelsfrei als Th2-vermittelte Autoimmunerkrankungen detektiert werden. Der Einfluss von IL-4 auf Erkrankungsschwere und Entstehung scheint zwar sehr wahrscheinlich, konnte aber nicht nachgewiesen werden.

Um weitere Abklärung zu erreichen, scheint eine Überprüfung der Tendenzen an einem größeren Kollektiv sinnvoll.

Hinsichtlich der Entwicklung eines umfassenden genetischen Untersuchungsprogramms für BP und PV ist es sicherlich zielführend, das Augenmerk zusätzlich auf andere genetische Veränderungen zu lenken.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

1. Abadir R (1967) Pemphigoid, bronchial neoplasm and radiotherapy. *Proc R Soc Med* 60: 33 - 34
2. Ahmed AR (2001) Intravenous immunoglobulin therapy for patients with bullous pemphigoid unresponsive to conventional immunosuppressive treatment. *J Am Acad Dermatol* 45 (6): 825 - 835
3. Ahmed AR (2006) Use of intravenous immunoglobulin therapy in autoimmune blistering diseases. *Int Immunopharmacol* 6 (4): 557 - 578
4. Ahmed AR, Blose DA (1984) Pemphigus vegetans: Neumann type and Hallopeau type. *Int J Dermatol* 23: 135 - 141
5. Ahmed AR, Colon JE (2001) Comparison Between Intravenous Immunoglobulin and Conventional Immunosuppressive Therapy Regimens in Patients With Severe Oral Pemphigoid. *Arch Dermatol* 137: 1181 - 1189
6. Ahmed AR, Mohimen A, Yunis EJ, Mirza NM, Kumar V, Neutner EH, Alper CA (1993) Linkage of pemphigus vulgaris antibody to the major histocompatibility complex in healthy relatives of patients. *J Exp Med* 177 (2): 419 - 424
7. Ahmed AR, Mohimen A, Yunis EJ, Mirza NM, Kumar V, Beutner EH, Alper CA (1993) Linkage of pemphigus vulgaris antibody to the major histocompatibility complex in healthy relatives of patients. *J Exp Med* 177: 419 - 424
8. Ahmed AR, Spigelman Z, Cavacini LA, Posner MR (2006) Treatment of pemphigus vulgaris with rituximab and intravenous immune globulin. *N Engl J Med* 355 (17): 1772 - 1779
9. Ahmed AR, Wagner R, Khatri K, Notani G, Awdeh Z, Alper CA, Yunis EJ (1991) Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5056 - 5060

10. Aho S, Uitto J (1999) 180-kD bullous pemphigoid antigen/type XVII collagen: tissue-specific expression and molecular interaction with keratin 18. *J Cell Biochem* 72: 356 - 367
11. Aithal GP, Day CP, Leathart J, Daly AK, Hudson M (2001) Association of single nucleotide polymorphisms in the interleukin-4 gene and interleukin-4 receptor gene with Crohn's disease in a British population. *Genes and Immunity* 2: 44 - 47
12. Aksakal BA, Ozsoy E, Arnavut O, Ali Gurer M (2003) Oral terbinafine-induced bullous pemphigoid. *Ann Pharmacother* 37 (11): 1625 - 1627
13. Allegretta M, Nicklas JA, Siram S, Albertini RJ (1990) T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *Science (Wash. DC)* 247: 718 - 721
14. Amagai M, Hashimoto T, Shimizu N, Nishikawa T (1994) Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg 3) produced by baculovirus. *J Clin Invest* 94: 59 - 67
15. Amagai M, Komai A, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Yamada T, Kitajima Y, Ohya K, Iwanami H, Nishikawa T (1999) Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 140: 351 - 357
16. Amagai M, Tsunoda K, Suzuki H, Nishifuji K, Koyasu S, Nishikawa T (2000) Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. *J Clin Invest* 105: 625 - 631
17. Amagai M, Tsunoda K, Zillikens D, Nagai T, Nishikawa T (1999) The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J Am Acad Dermatol* 40: 167 - 170
18. Ambach A, Zillikens D, Klingert B, Hartmann AA, Burg G (1992) Immunphänotypisierung des mononuklären Infiltrats beim Bullösen Pemphigoid. *Hautarzt* 42: 81 - 85
19. Ameglio F, D'Auria L, Boifati C, Ferraro C, Mastroinni A, Giacalone B (1998) Cytokine pattern in blister fluid and serum of patients with bullous pemphigoid: relationships with disease intensity. *Br J Dermatol* 138: 611 - 614

20. Amer MH, Akhtar M, Mackey DM, Butler PG (1982) Bullous pemphigoid after chemotherapy for choriocarcinoma. *Int J Dermatol* 21: 32 - 35
21. Andreadis D, Lorenzini G, Drakoulakos D, Belazi M, Mihailidou E, Velkos G, Mourellou-Tsatsou O, Antoniadis D (2006) Detection of pemphigus desmoglein 1 and desmoglein 3 autoantibodies and pemphigoid BP180 autoantibodies in saliva and comparison with serum values. *Eur J Oral Sci* 114 (5): 374 - 380
22. Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA (1982) Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med* 306: 1189 - 1192
23. Banfield CC, Wojnarowska F, Allen J, George S, Venning VA, Welsh KI (1998) The association of HLA-DQ7 with bullous pemphigoid is restricted to men. *Br J Dermatol* 138: 1085 - 1090
24. Bastuji-Garin S, Joly P, Picard-Dahan C, Bernard P, Vaillant L, Pauwels C, Salagnac V, Lok C, Roujeau JC (1996) Drugs associated with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 132: 272 - 276
25. Bastuji-Garin S, Souissi R, Blum L, Turki H, Nouria R, Jomaa B, Zahaf A, Osman AB, Mokhar I, Fazaa B, Revuz J, Roujeau JC, Kamoun MR (1995) Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women. *J Invest Dermatol* 104; 302 - 305
26. Baum S, Scope A, Barzilai A, Azizi E, Trau H (2006) The role of IVIg treatment in severe pemphigus vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 20 (5): 548 - 552
27. Beckers RCY, Brand A, Vermeer BJ, Boom BW (1995) Adjuvants high-dose intravenous gammaglobulin in the treatment of pemphigus and bullous pemphigoid: experience in six patients. *Br J Dermatol* 133: 289 - 293
28. Beghe B, Barton S, Rorke S, Peng Q, Sayers I, Gaunt T, Keith TP, Clough JB, Holgate ST, Holloway JW (2003) Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha chain genes confer susceptibility to asthma and atopy in a Caucasian population. *Clin Exp Allergy* 33 (8): 1111 - 1117

29. Bernard P, Bedane C, Bonnetblanc JM (1997) Anti-BP 180 autoantibodies as a marker of poor prognosis in bullous pemphigoid: a cohort analysis of 94 elderly patients. *Br J Dermatol*; 136: 694 - 698
30. Bernard P, Vaillant L, Labeille B, Bedane C, Arbeille B, Denoeux J-P, Lorette G, Bonnetblanc J-M, Prost C (1995) Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin disease in three French regions. *Arch Dermatol* 31: 48 - 52
31. Beutner EH, Jordon RE (1964) Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescence staining. *Proc Soc Exp Biol Med* 117: 505 - 510
32. Bhol KA, Ahmed AR, Aoki V, Mohimen A, Nagarwalla N, Natarajan K (1995) Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenetic and nonpathogenetic autoantibodies in pemphigus vulgaris: a model for autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5239 - 5243
33. Bhol KA, Mohimen A, Ahmed AR (1994) Correlation of subclasses in IgG with disease activity in pemphigus vulgaris. *Dermatology* 189 (Suppl 1): 85 - 89
34. Binet O, Brunetiere RA, Rabay G, Garely EB, Galian A, Villet R (1983) Immunologic studies of bullous pemphigoid associated with adenocarcinoma of the colon. *N Engl J Med* 308: 460 - 461
35. Bird P, Friedman PS, Ling N, Bird AG, Thompson RA (1986) Subclass distribution of IgG autoantibodies in bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 86: 21 - 25
36. Bodokh I, Lacour JP, Bourdet JF, Rodot S, Botcazon V, Ortonne JP (1994) Reactivation de pemphigoïde bulleuse apres vaccination grippale. *Therapie* 49: 154
37. Bornhovd E, Partscht K, Flaig MJ, Messer G (2001) Bullous scabies and scabies-triggered bullous pemphigoid. *Hautarzt* 52 (1): 56 - 61
38. Borradori L, Sonnenberg A (1999) Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol* 112: 411 - 418
39. Boussiotis VA, Nadler LM, Strominger JL, Goldfeld AE (1994) Tumor necrosis factor- α is an autocrine growth factor for normal human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7007 - 7011

40. Brandsen R, Frusic-Zlotkin M, Lyubimov H, Yunes F, Michel B, Tamir A, Milner Y, Brenner S (1997) Circulating pemphigus IgG in families of patients with pemphigus: Comparison of indirect immunofluorescence, direct immunofluorescence, and immunoblotting. *J Am Acad Dermatol* 36: 44 - 52
41. Braun-Falco O, Plewig G, Wolf HH (2000) *Dermatologie und Venerologie*. Springer, Berlin, 664 - 680
42. Braun-Falco O, Plewig G, Wolf HH, Burgdorf WHC, Landthaler M (2005) *Dermatologie und Venerologie*. Springer, Heidelberg, 607 - 638
43. Braun-Falco O, Rupec M (1967) Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Dynamik der Blasenbildung bei Bullösem Pemphigoid. *Arch Klin Exp Derm* 230: 1 - 12
44. Braun-Falco O, Vogell W (1965) Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Dynamik der Akantholyse bei Pemphigus vulgaris. II. Mitteilung: Die akantholytische Blase. *Arch Klin Exp Derm* 223: 533 - 550
45. Brodsky RA, Petri M, Smith BD, Seifert EF, Spivak JL, Styler M, Dang CV, Brodsky I, Jones RJ (1998) Immunoablative high-dose cyclophosphamide without stem-cell rescue for refractory, severe autoimmune disease. *Ann Intern Med* 129: 1031 - 1035
46. Brown MD, Dubin HV (1987) Penicillamine induced bullous pemphigoid like eruption. *Arch Dermatol* 123: 1119 - 1120
47. Büdinger L, Borradori L, Yee C, Eming R, Ferencik R, Grosse-Wilde H, Merk HF, Yancey KB, Hertl M (1998) Identification and characterization of autoreactive T cell responses to bullous pemphigoid antigen 2 in patients and healthy controls. *J Clin Invest* 102: 2082 - 2089
48. Burmester GR, Pezzutto A (1998) *Taschenatlas der Immunologie*. Thieme, Stuttgart, New York, 1 - 18
49. Bushkell LL, Jordon RE (1983) Bullous pemphigoid: a cause of peripheral blood eosinophilia. *J Am Acad Dermatol* 8: 648 - 651

50. Buxton RS, Cowin P, Franke WW, Garrod DR, Green KJ, King IA, Koch PJ, Magee AI, Rees DA, Stanley JR, Steinberg MS (1993) Nomenclature of desmosomal cadherins. *J Cell Biol* 121: 481 - 483
51. Buxton RS, Magee AI (1992) Structure and interactions of desmosomal and other cadherins. *Semin Cell Biol* 3: 157 - 167
52. Bystryn JC, Jiao D (2006) IVIg selectively and rapidly decreases circulating pathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris. *Autoimmunity* 39 (7): 601 - 607
53. Bystryn JC, Steinmann NM (1996) The Adjuvant Therapy of Pemphigus. *Arch Dermatol* 132: 203 - 212
54. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM (1994) Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*; 182: 1259 - 1264
55. Caggana M, Walker K, Reilly AA, Conroy JM, Duva S, Walsh AC (1999) Population-based studies reveal differences in the allelic frequencies of two functionally significant human interleukin-4 receptor polymorphisms in several ethnic groups. *Genet Med* 1 (6): 267 - 271
56. Carson PJ, Hameed A, Ahmed AR (1996) Influence of treatment on the clinical course of pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 34: 645 - 652
57. Chen H, Paul WE (1997) Cultured NK1.1+ CD4+ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1. *J Immunol* 159: 2240 - 2249
58. Chomarat P, Banchereau J (1997) An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur Cytokine Netw* 8: 333 - 344
59. Chomarat P, Banchereau J (1998) Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *Int Rev Immunol* 17: 1 - 52
60. Cianderoni A, Schröder JT, Kim J, Schmidt JW, Lichtenstein LM, Georas SN, Casolaro V (2001) Selective inhibition of interleukin-4 gene expression in human T cells by aspirin. *Blood* 97 (6): 1742 - 1749

61. Coffman RL, Ohara J, Bond MW, Carty J, Ziotnik A, Paul WE (1986) B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J Immunol* 136: 4538 - 4541
62. Coffman RL, Seymour BWP, Lebman DA, Hiraki DD, Christiansen JA, Shrader B, Cherwinski HM, Savelkoul HFJ, Finkelman FD, Bond MW, Mosmann TR (1988) The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 192: 5 - 28
63. Corti MC, Salive ME, Guralnik JM (1996) Serum albumin and physical function as predictors of coronary heart disease mortality and incidence in older persons. *J Clin Epidemiol* 49: 519 - 526
64. Cosman D (1993) The hematopoietin receptor superfamily. *Cytokine* 5: 95 - 106
65. Costello MJ, Jaimovich L, Dannenberg M (1957) Treatment of pemphigus with corticosteroids. *J Am Med Ass* 165: 1249 - 1255
66. Cui T, Wang L, Wu J, Hu L, Xie J (2003) Polymorphisms of IL-4, IL-4R alpha, and AICDA genes in adult allergic asthma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 23 (2): 134 - 137
67. Daley T, Metcalfe DD, Akin C (2001) Association of the Q576R polymorphism in the interleukin-4 receptor α chain with indolent mastocytosis limited to the skin. *Blood* 98 (3): 880 - 882
68. Daly AK, Day CP (2001) Candidate gene case-control association studies: advantages and potential pitfalls. *Br J Clin Pharmacol* 52: 489 - 499
69. Defrance T, Aubry JP, Rousset F, Vanbervliet B, Bonnefoy JY, Arai N, Takebe Y, Yokota T, Lee F, Arai K (1987) Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B-lymphocytes. *J Exp Med* 165: 1459 - 1467
70. Deichmann K, Bardutzky J, Forster J, Heinzmann A, Kuehr J (1997) Common polymorphisms in the coding part of the IL-4 receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 231 (3): 696 - 697
71. Delaporte E, Dubost-Brama A, Ghohestani R, Nicolas JF, Neyrinck JL, Bergoend H, Janin A, Capron M (1996) IgE autoantibodies directed against the major bullous

- pemphigoid antigen in patients with a severe form of pemphigoid. *J Immunol* 157: 3642 - 3647
72. Delgado JC, Turbay D, Yunis EJ, Yunis JJ, Morton ED, Bhol K, Norman R, Alper CA, Good RA, Ahmed R (1996) A common major histocompatibility complex class II allele HLA-DQB*0301 is present in clinical variants of pemphigoid. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8569 - 8571
 73. Ding X, Aoki V, Diaz LA, Lopez-Swidorski A, Mascaro JM, Fairly JA (1997) Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. *J Invest Dermatol* 109: 592 - 596
 74. Döpp R, Schmidt E, Chimanovitch I, Leverkus M, Bröcker EB, Zillikens D (2000) IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in bullous pemphigoid: Serum levels reflect disease activity. *J Am Acad Dermatol* 42: 577 - 583
 75. Dubucquoi S, Desreumaux P, Janin A, Klein O, Goldman M, Tavernier J, Capron A, Capron M (1994) Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *J Exp Med* 179: 703 - 708
 76. Eming R, Büdinger L, Riechers R, Christensen O, Bohlen H, Kalish R, Hertl M (2000) Frequency analysis of autoreactive T-helper 1 and 2 cells in bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay. *Br J Dermatol* 143: 1279 - 1282
 77. Endo H, Iwamoto I, Fujita M, Okamoto S, Yoshida S (1992) Increased immunoreactive interleukin-5 levels in blister fluids of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res* 284: 312 - 314
 78. Enk A, Hertl M, Messer G, Meurer M, Rentz E, Zillikens D (2003) Einsatz hochdosierter intravenöser Immunglobuline in der Dermatologie. *JDDG* 1 (3): 183 - 190
 79. Ernst TM, Marsch W (1982) Induktion eines lokalisierten Pemphigoids durch energiereiche Strahlen. *Dermatologica* 164: 73 - 81
 80. Esaki C, Kitajima Y, Osada K, Yamada T, Seishima M (1995) Pharmacologic evidence for involvement of phospholipase C in pemphigus IgG-induced inositol 1,4,5-

triphosphate generation, intracellular calcium increase, and plasminogen activator secretion in DJM-cells, a squamous cell carcinoma line. *J Invest Dermatol* 105: 329 - 333

81. Eyre RW, Stanley JR (1988) Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen. *J Clin Invest* 81: 807 - 812
82. Finlay AY, Kahn K (1994) Dermatology life quality index (DLQI) – a simple practical measure for routine clinical use. *Clin Exp Dermatol* 19: 210 - 216
83. Fivenson DP (2006) The mechanisms of action of nicotinamide and zinc in inflammatory skin disease. *Cutis* 77: 5 - 10
84. Fournier B, Descamps VF, Bouscarat F, Crickx B, Belaich S (1996) Bullous pemphigoid induced by vaccination. *Br J Dermatol* 135: 153 - 154
85. Futei Y, Amagai M, Ishii K, Kuroda-Kinoshita K, Ohya K, Nishikawa T (2001) Predominant IgG4 subclass in autoantibodies of pemphigus vulgaris and foliaceus. *J Dermatol Sci* 26: 55 - 61
86. Galloro G, Mignogna M, de Werra C, Magno L, Diamantis G, Ruoppo E, Iovino P (2005) The role of upper endoscopy in identifying oesophageal involvement in patients with oral pemphigus vulgaris. *Dig Liver Dis* 37 (3): 195 - 199
87. Gammon WR, Merrit CC, Lewis DM, Sams Jr WM, Carlo JR, Wheeler Jr CE (1982) An in vitro model of immune complex-mediated basement membrane zone separation caused by pemphigoid autoantibodies, leukocytes, and complement. *J Invest Dermatol* 78: 285 - 290
88. Gascan H, Gauchat JF, Roncarolo MG, Yssel H, Spits H, Vries JE de (1991) Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. *J Exp Med* 173: 747 - 750
89. Georgi M, Scheckenbach C, Kromminga A, Partscht K, Messer K, Bröcker EB, Zillikens D (2001) Mapping of epitopes of the BP180 ectodomain targeted by IgA and IgG autoantibodies in patients with lamina lucida-type of linear IgA disease. *Arch Dermatol Res* 293: 109 - 114

90. Ghaffarpour G, Jalali MH, Yaghmaii B, Mazloomi S, Solatani-Arabshahi R (2006) Chloroquine/hydroxychloroquine-induced pemphigus. *Int J Dermatol* 45 (10): 1261 - 1263
91. Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA (1992) Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J Invest Dermatol* 99: 243 - 250
92. Goebeler M, Sitaru C, Zillikens D (2004) Bullöse Autoimmundermatosen (II): Therapie. *JDDG* 9 (2): 774 - 791
93. Goldberg I, Ingher A, Brenner S (2004) Pemphigus vulgaris triggered by rifampicin and emotional stress. *Skinmed* 3 (5): 294
94. Goldman M, Druet P, Gleichmana E (1991) Th2 cells in systemic autoimmunity: insights from allogenic disease and clinically induced autoimmunity. *Immunol Today* 12: 223 - 227
95. Grattan CEH (1985) Evidence of an association between bullous pemphigoid and psoriasis. *Br J Dermatol* 113: 281 - 283
96. Grundmann-Kollmann M, Korting HC, Behrens S, Kaskel P, Leiter U, Krahn G, Kerscher M, Peter RU (1999) Mycophenolate mofetil: A new therapeutic option in the treatment of blistering autoimmune disease. *J Amer Acad Dermatol* 40: 957 - 960
97. Gruss HJ, Dower SK (1995) Tumor necrosis factor ligand superfamily: Involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood*; 85: 3378 - 3404
98. Guillaume JC, Vaillant L, Bernard P, Picard C, Prost C, Labeille B, Guillot B, Foldès- Pauwels C, Prigent F, Joly P, Cordoliani F, Salagnac V, Machet L, Aldigier JC, Crickx B, Roujeau JC (1993) Controlled Trial of Azathioprine and Plasma Exchange in Addition to Prednisolone in the Treatment of Bullous Pemphigoid. *Arch Dermatol* 129: 49 - 53
99. Gul U, Gonul M, Cakmak SK, Kilic A (2006) Pemphigus vulgaris induced by honeybee sting? *Acta Derm Venereol* 86 (5): 467 - 468
100. Guo L, Degenstein L, Dowling JC, Yu QC, Wollmann R, Perman B, Fuchs E (1995) Gene targeting of BPAG1: abnormalities in mechanical strength and cell migration in stratified epithelia and neurologic degeneration. *Cell* 81: 223 - 243

101. Haase C, Büdinger L, Borradori L, Yee C, Merk HF, Yancey KB, Hertl M (1998) Detection of IgG autoantibodies in the sera of patients with bullous and gestational pemphigoid: ELISA studies utilizing a baculovirus-encoded form of bullous pemphigoid antigen 2. *J Invest Dermatol* 110: 282 - 286
102. Hackstein H, Hofmann H, Bohnert A, Bein G (1999a) Definition of human interleukin-4 receptor chain haplotypes and allelic association with atopy markers. *Hum Immunol* 60 (11): 1119 - 1127
103. Hackstein H, Klüter H, Fricke L, Hoyer J, Bein G (1999b) The IL-4 receptor α -chain variant Q576R is strongly associated with decreased kidney allograft survival. *Tissue Antigens* 54: 471 - 477
104. Hahn K, Kippes W, Amagai M, Rzany B, Bröcker EB, Zillikens D (2000) Klinik und Immunpathologie bei 48 Patienten mit Pemphigus. *Hautarzt* 51: 670 - 677
105. Hahn-Ristic K, Rzany B, Amagai M, Brocker EB, Zillikens D (2002) Increased incidence of pemphigus vulgaris in southern Europeans living in Germany compared with native Germans. *J Eur Dermatol Venereol* 16 (1): 68 - 71
106. Harman KE, Black MM (1999) High-dose intravenous immune globulin for the treatment of autoimmune blistering diseases: an evaluation of its use in 14 cases. *Br J Dermatol* 140: 865 - 874
107. Harman KE, Gratian MJ, Seed PT, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM (2000) Diagnosis of pemphigus by ELISA: a critical evaluation of two ELISAs for the detection of antibodies to the major pemphigus antigens, desmoglein 1 and 3. *Clin Exp Dermatol* 2: 236 - 240
108. Harman KE, Seed PT, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM (2001) The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. *Br J Dermatol* 144: 775 - 780
109. Hashimoto T, Amagai M, Watanabe K, Dmochowski M, Chidgey MAJ, Yue KKM, Garrod DR, Nishikawa T (1995) A case of pemphigus vulgaris showing reactivity with pemphigus antigens (Dsg 1 and Dsg 3) and desmocollins. *J Invest Dermatol* 104: 541 - 544

110. Haustein UF, Lohrlich I, Herrmann K (1984) Pathogenetic studies in bullous pemphigoid: review of literature and our own results. *J Dermatol* 11: 508 - 518
111. Heaphy MR, Albrecht J, Werth VP (2005) dapsone as a glucocorticoid-sparing agent in maintenance-phase pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol* 141 (6): 699 - 702
112. Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Cahtila TA (1997) The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin 4 receptor. *N Engl J Med* 337 (24): 1720 - 1725
113. Hertl M (2000) Humoral and Cellular Autoimmunity in Autoimmune Bullous Skin Disorders. *Int Arch Allergy Immunol* 122: 91 - 100
114. Hertl M, Amagai M, Ishji K, Karr R, Katz SI (1996) The HLA-DR11-restricted T cell response to the extracellular portion (EC 1-5) of pemphigus vulgaris antigen (PVA) is modulated by polymorphisms of the β 1 chain. *J Invest Dermatol* 106: 813
115. Hertl M, Amagai M, Sundaram H, Stanley J, Ishii K, Katz SI (1998a) Recognition of desmoglein 3 by autoreactive T cells in pemphigus vulgaris patients and normals. *J Invest Dermatol* 110: 62 - 66
116. Hertl M, Karr RW, Amagai M, Katz SI (1998b) Heterogeneous MHC II restriction pattern of autoreactive desmoglein 3-specific T cell responses in pemphigus vulgaris patients and normals. *J Invest Dermatol* 110: 388 - 392
117. Hertl M, Riechers R (1999) Analysis of the t cells that are potentially involvend in autoantibody production in pemphigus vulgaris. *J Dermatol* 26 (11): 748 - 752
118. Hertl M, Schuler G (2002) Bullöse Autoimmundermatosen Teil 1: Klassifikation. *Hautarzt* 53: 207 - 221
119. Hertl M, Schuler G (2002) Bullöse Autoimmundermatosen Teil 2: Pathogenese. *Hautarzt* 53: 277 - 285
120. Hertl M, Schuler G (2002) Bullöse Autoimmundermatosen Teil 3: Diagnostik und Therapie. *Hautarzt* 53: 352 - 366
121. Herzog S, Schmidt E, Goebeler M, Brocker EB, Zillikens D (2004) Serum levels of autoantibodies to desmoglein 3 in patients with therapy-resistant pemphigus vulgaris

successfully treated with adjuvant intravenous immunoglobulins. *Acta Derm Venerol* 84 (1): 48 - 52

122. Hietanen J, Salo OP (1982) Pemphigus: an epidemiological study of patients treated in Finnish hospitals between 1969 and 1978. *Acta Derm Venereol* 62: 491 - 496
123. Hirako Y, Usukura J, Uematsu J, Hashimoto T, Kitajima Y, Owaribe K (1998) Cleavage of BP180, a 180-kDa bullous pemphigoid antigen, yields a 120-kDa collagenous extracellular polypeptide. *J Biol Chem* 273: 9711 - 9717
124. Hirsch-Kaufmann M (1996) *Biologie für Mediziner*. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart und New York: 226 - 228
125. Hornschuh B, Hamm H, Wever S, Hashimoto T, Schroder U, Brocker EB, Zillikens D (1997) Treatment of 16 patients with bullous pemphigoid with oral tetracycline and nicotinamide and topical clobetasol. *J Amer Acad Dermatol* 36: 101 - 103
126. Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM (1992) Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6065 - 6069
127. Husain SR, Gill P, Kreitman RJ, Pastan I, Puri RK (1997) Interleukin-4 receptor expression on AIDS-associated Kaposi's sarcoma cells and their targeting by a chimeric protein comprised of circularly permuted interleukin-4 and *Pseudomonas* exotoxin. *Mol Med* 3: 327 - 338
128. Hutchinson IV, Pravica V, Perrey C, Sinnott P (1999) Cytokine gene polymorphisms and relevance to forms of rejection. *Transplant Proc* 31: 734 - 736
129. Hutchinson IV, Turner DM, Sankaran B, Awad MR, Pravica V, Sinnott P (1998b) Cytokine genotypes in allograft rejection: Guidelines for immunosuppression. *Transplant Proc* 30: 3991 - 3992
130. Hutchinson IV, Turner DM, Sankaran D, Awad MR, Sinnott PJ (1998a) Influence of cytokine genotypes on allograft rejection. *Transplant Proc* 30: 862 - 863
131. Idzerda RL, March CJ, Mosley B, Lyman SD, Vanden Bos T, Gimpel SD, Din WS, Grabstein KH, Widmer MB, Park LS (1990) Human interleukin 4 receptor confers

- biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily. *J Exp Med* 171 (3): 861 - 873
132. Inaoki M, Takehara K (1998) Increased serum levels of IL-5, IL-6, and IL-8 in bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 16: 152 - 157
 133. Inoue T, Kira R, Nakao F, Ihara K, Bassuny WM, Kusuhara K, Nihei K, Takeshita K, Hara T (2002) Contribution of the interleukin 4 gene to susceptibility to subacute sclerosing panencephalitis. *Arch Neurol* 59 (5): 822 - 827
 134. Iranzo P, Lopez I, Robles MT, Mascaro JM Jr, Campo E, Herrero C (2004) Bullous pemphigoid associated with mantle cell lymphoma. *Arch Dermatol* 140 (12): 1496 - 1499
 135. Jahn S, Henschel A, Audring H, Barthelmes H, Trefzer U, Schultz-Ehrenburg U, Schulze P, Sterry W (1997) Auftreten eines Bullösen Pemphigoids unter PUVA-Therapie bei einem Patienten mit Psoriasis vulgaris. *Zeitschrift für Geschlechtskrankheiten H + G* 9 (72): 670 - 674
 136. Joly P, Fontaine J, Roujeau JC (2005) The role of topical corticosteroids in bullous pemphigoid in the elderly. *Drugs Aging* 22 (7): 571 - 576
 137. Joly P, Rouieau JC, Benichou J (2002) A comparison of oral and topical corticosteroids in patients with bullous pemphigoid. *N Engl J Med* 346 (3): 321 - 327
 138. Jones CC, Hamilton RG, Jordon RE (1988) Subclass distribution of human IgG autoantibodies in pemphigus. *J Clin Immunol* 8: 43 - 49
 139. Jones E, Sobkowski WW, Murray S, Walsh NMG (1993) Concurrent pemphigus and myasthenia gravis as manifestations of penicillamine toxicity. *J Am Acad Dermatol* 28 (4): 655 - 656
 140. Jordon RE (1987) Pemphigus. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF (Editors). *Dermatology in general medicine*. Mc Graw - Hill Publ. Comp. New York: 571 - 579
 141. Jordon RE, Beutner EH, Witebsky E, Blumenthal G, Hale WF, Lever WF (1967) Basement membrane antibodies in bullous pemphigoid. *JAMA* 200: 751 - 756

142. Jordon RE, Kawana S, Fritz KA (1985) Immunopathologic mechanism in pemphigus and bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 85: 72 - 78
143. Jun TY, Lee KU, Pae CU, Chae JH, Bahk WM, Kim KS, Han H (2003) Polymorphisms of interleukin-4 promotor and receptor gene for schizophrenia in the Korean population. *Psychiatry Clin Neurosci* 57 (6): 613
144. Jung EG (1995) *Duale Reihe. Dermatologie. 4. Auflage. Hippokrates Verlag. Stuttgart*: 280 - 297
145. Jung M, Kippes W, Messer G, Zillikens D, Rzany B (1999) Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence. *J Am Acad Dermatol* 41: 266 - 268
146. Kanemitsu S, Takabayashi A, Sasaki Y (1999) Association of interleukin-4 receptor and interleukin-4 promotor gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 42: 1298 - 1300
147. Katz SI, Dahl MV, Penneys N, Trapani RJ, Rogentine N (1973) HLA antigens in pemphigus. *Arch Dermatol* 108: 53 - 55
148. Kawahara Y, Hashimoto T, Ohata Y, Nishikawa T (1996) Eleven cases of bullous pemphigoid treated with a combination of minocycline and nicotinamide. *Eur J Dermatol* 6: 427 - 429
149. Kawakami K, Leland P, Puri RK (2000) Structure, function, and targeting of interleukin 4 receptors on human head and neck cancer cells. *Cancer Res* 60: 2981 - 2987
150. Kay AB, Ying S, Varney V, Gaga M, Durham SR, Moqbel R, Wardlaw AJ, Hamid Q (1991) Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J Exp Med* 173: 775 - 778
151. Kelly SE, Wojnarowska F (1988) The use of chemically split tissue in the detection of circulating anti-basement membrane zone antibodies in bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid. *Br J Dermatol* 118: 31 - 40

152. Kippes W, Schmidt E, Roth A, Rzany B, Brocker EB, Zillikens D (1999) Immunopathologic changes in 115 patients with bullous pemphigoid. *Hautarzt* 50 (12): 866 - 872
153. Kirtschig G, Mittag H, Wolf M, Gorski A, Happle R (1999) Three different autoimmune bullous diseases in one family: is there a common genetic base? *Br J Dermatol* 140 (2): 3222 - 327
154. Kitajima Y (1996) Adhesion molecules in the pathophysiology of bullous diseases. *Eur J Dermatol* 6: 399 - 405
155. Koch PJ, Mahoney MG, Ishikawa H, Pulkkinen L, Uitto J, Shultz L, Murphy GF, Whitacker-Menezes D, Stanley JR (1997) Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol* 137: 1091 - 1102
156. Kolbach DN, Remme JJ, Bos WH, Jonkman MF, de Jong MCJM, Pas HH, van der Meer JB (1995) Bullous pemphigoid successfully controlled by tetracycline and nicotinamide. *Br J Dermatol* 133: 88 - 90
157. Korman N (1988) Pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 18: 1219 - 1238
158. Korman N, Eyre RW, Zone J, Stanley JR (1991) Drug-Induced Pemphigus: Autoantibodies Directed Against the Pemphigus Antigen Complexes Are Present in Penicillamine and Captopril-Induced Pemphigus. *J Invest Dermatol* 91: 273 - 276
159. Kowalczyk AP, Bornslaeger EA, Norvell SM, Palka HL, Green KJ (1999) Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. *Int Rev Cytol* 185: 237 - 302
160. Krain LS, Terasaki PI, Newcomer VD, Mickey MR (1973) Increased frequency of HLA - A10 in pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol* 108: 803 - 805
161. Kruse S, Forster J, Kühr J, Deichmann KA (1999) Characterization of the membrane bound and a soluble form of human IL4R produced by alternative splicing. *Int Immun* 11: 1965 - 1970
162. Kunte C, Barbosa JM, Wolff H, Meurer M (1997) Brasilianischer Pemphigus foliaceus (Fogo selvagem). *Hautarzt* 48: 228 - 233

163. Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, Mutasim DF, Diaz LA (1986) Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. *J Immunol* 136: 1231 - 1235
164. Lenz P, Amagai M, Volc-Platzer B, Stingl G, Kirnbauer R (1999) Desmoglein 3-ELISA. *Arch Dermatol* 135: 143 - 148
165. Lever WF (1967) Differentialdiagnose zwischen Pemphigus vulgaris, Bullösem Pemphigoid und Dermatitis herpetiformis. *Med Klin* 62 Nr. 30: 1173 - 1176
166. Lever WF (1965) Pemphigus and bullous pemphigoid. CC Thomas. Springfield: 85 - 99
167. Lin MS, Swartz SJ, Lopez A, Ding X, Fernandez-Vina MA, Stastny P, Fairley JA, Diaz LA (1997) Development and characterization of desmoglein-3 specific T cells from patients with pemphigus vulgaris. *J Clin Invest* 99: 31 - 40
168. Lindelöf B, Islam N, Eklund G, Arfors L (1990) Pemphigoid and cancer. *Arch Dermatol* 126: 66 - 68
169. Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, Giudice GJ (1993) A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest* 92: 2480 - 2488
170. Liu Z, Giudice GJ, Swartz SJ, Fairly LA, Till GO, Troy JL, Diaz LA (1995) The role of complement in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 95: 1539 - 1544
171. Lohrisch I, Freistedt B, Haustein UF (1980) HLA- Merkmale beim Parapemphigus. *Dermatol Monatsschr* 166: 247 - 248
172. Loiseau P, Lecleach L, Prost C, Lepade V, Busson M, Bastuji-Garin S, Poujeau JC, Charron D (2000) HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Autoimmun* 15 (1): 67 - 73
173. Lombardi ML, Mercurio O, Ruocco V, Lo Schiavo A, Lombardi V, Guerrera V, Pirozzi G, Manzo C (1999) Common human leukocyte antigen alleles in pemphigus

- vulgaris and pemphigus foliaceus Italian patients. *J Invest Dermatol* 113 (1): 107 - 110
174. Lowenthal JW, Castle BE, Christiansen J, Schreurs J, Rennick D, Arai N, Hoy P, Takebe Y, Howard M (1988) Expression of high affinity receptors for murine interleukin 4 (BSF-1) on hemopoietic and nonhemopoietic cells. *J Immunol* 140: 456 - 464
175. Lyubimov H, Yoryv S, Feinstein Y (1993) The presence of circulating pemphigus antibodies (PV-IgG) in first degree relatives of Jewish pemphigus patients. *J Dermatol Sci* 6: 105
176. Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger KL, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR (1999) Explanation for localization of blisters in pemphigus patients. *J Clin Invest* 103: 461 - 468
177. Martin RL, Mc Sweeney GW, Schneider J (1983) Fatal pemphigus vulgaris in a patient taking piroxicam. *N Engl J Med* 309: 795 - 796
178. Masouyé I, Schmied E, Didierjean I (1989) Bullous pemphigoid and multiple sclerosis: more than a coincidence? *J Am Acad Dermatol* 21: 63 - 68
179. Masunaga T, Shimizu H, Yee C, Borradori L, Lazarova Z, Nishikawa T, Yancey KB (1997) The extracellular domain of the lamina densa of BPAG2 localizes to anchoring filaments and its carboxy terminus extends to the lamina densa of normal human epidermal basement membrane. *J Invest Dermatol* 109: 200 - 206
180. Mazzi G, Raineri A, Zanolli FA, Da Ponte C, De Roia D, Santarossa L, Guerra R, Orazi BM (2003) Plasmapheresis therapy in pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. *Transfus Apheresis Sci* 28 (1): 13 - 18
181. McGuire W, Hill AVS, Allsopp CEM, Greenwood BM, Kwiatkowski D (1994) Variation in the TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*; 371: 508 - 511
182. Mehravaran M, Morvay M, Molnár K, Oláh J, Korom I, Husz S, Dobozy A (1998) Juvenile pemphigus foliaceus. *Br J Dermatol* 139: 496 - 499

183. Melms A, Chrestel S, Schalke BCG, Wekerle H, Mauron A, Ballivet M, Barkas T (1989) Autoimmune T lymphocytes in myasthenia gravis. Determination of target epitopes using T lines and recombinant products of the mouse nicotinic acetylcholine receptor gene. *J Clin Invest* 83: 785 - 790
184. Messer G, Meurer M (2000) Diagnostische Bedeutung von Autoantikörpern bei bullösen Dermatosen. *Dtsch. Med. Wschr.* 125: 1 - 4
185. Messer G, Sitzmann N, Feucht H, Meurer M (1995) High-dose intravenous immunoglobulins for immediate control of severe pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 113: 1014 - 1016
186. Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blömer K, Papa GR, Riethmüller G, Weiß EH (1991) Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF- β gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF- β production. *J Exp Med* 173: 209 - 219
187. Meurer M (1998) Alternativen zur immunsuppressiven Therapie. In: Plewig G, Wolff H (Hrsg.). *Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie*. Band XVI. Springer, Berlin, 259 - 268
188. Meurer M (1998) Clinical spectrum of autoimmune bullous skin diseases. *Clin Immunol* 9: 188 - 193
189. Meurer M, Messer G (2000) Therapie von Autoimmunkrankheiten. *Akt Dermatol* 26: 255 - 259
190. Michalaki H, Nicolas JF, Kanitakis J, Machado P, Roche P, Thivolet J (1990-91) T cells in bullous pemphigoid. Presence of activated CD4⁺ T cells at the basement membrane zone in pre- and peri-bullous skin. *Reg Immunol* 3 (3): 151 - 155
191. Milstein C (2000) With the benefit of hindsight. *Immunol Today* 21: 359 - 364
192. Millard TP, Smith HR, Black MM, Barker JNWN (1999) Bullous pemphigoid developing during systemic therapy with chloroquine. *Clin Exp Dermatol* 24: 263 - 265
193. Mitsuyasu H, Izuhara K, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Enomoto T, Kawai M, Sasaki S, Dake Y, Hamasaki N, Shirakawa T, Hopkin JM (1998) Ile50Val variant of

IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. *Nat Genet* 19 (2): 119 - 120

194. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokines activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348 - 2357
195. Mourellou O, Chaidemenos GC, Koussidou TH, Kapetis E (1995) The treatment of pemphigus vulgaris. Experience with 48 patients seen over an 11-year period. *Br J Dermatol* 133: 83 - 87
196. Mullins RJ, Cohen SB, Webb LM, Chernajovsky Y, Dayan CM, Londei M, Deldmann M (1995) Identification of thyroid stimulating hormone receptor-specific T cells in Graves' disease thyroid using autoantigen-transfected Epstein-Barr virus-transformed B cell lines. *J Clin Invest* 96: 30 - 37
197. Muramatsu T, Iida T, Tada H, Hatoko M, Kobayashi N, Ko T, Shirai T (1996) Bullous pemphigoid associated with internal malignancies: identification of 180 kD antigen by Western immunoblotting. *Br J Dermatol* 135: 782 - 784
198. Naito K, Morioka S, Ogawa H (1982) The pathogenic mechanisms of blister formation in bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 79: 303 - 306
199. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE (1999) The IL-4 receptor: signalling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 17: 701 - 738
200. Nguyen VT, Ndoye A, Shultz LD, Pittelkow MR, Grando SA (2000) Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris-like lesions. *J Clin Invest* 106 : 1467 - 1479
201. Nieters A, Brems S, Becker N (2001) Cross-sectional study on cytokine polymorphisms, cytokine production after T-cell stimulation and clinical parameters in a random sample of a German population. *Hum Genet* 108: 241 - 248
202. Nilsson G, Miettinen U, Ishizaka T, Ashman LK, Irani AM, Schwartz LB (1994) Interleukin-4 inhibits the expression of Kit and tryptase during stem cell factor-dependent development of human mast cells from fetal liver cells. *Blood* 84: 1519 - 1527

203. Noben-Trauth N, Shultz LD, Brombacher F, Urban JF Jr, Gu H, Paul WE (1997) An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4⁺ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (20): 10838 - 10843
204. Noelle R, Krammer PH, Ohara J, Uhr JW, Vitetta ES (1984) Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6149 - 6153
205. Obiri NI, Siegel J, Varricchio F, Puri RK (1994) Expression of high-affinity IL-4 receptors on human melanoma, ovarian and breast carcinoma cells. *Clin Exp Immunol* 95: 148 - 155
206. Ohara J, Paul WE (1987) Receptors for B-cell stimulatory factor-1 expressed on cells of haematopoietic lineage. *Nature* 325: 537 - 540
207. Ohara J, Paul WE (1988) Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8221 - 8225
208. Ohata C, Shirabe H, Takagi K, Kawatsu T, Hashimoto T (1997) Localized bullous pemphigoid after radiation therapy. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 77: 157 - 175
209. Okazaki A, Miyagawa S, Yamashina Y, Kitamura W, Shirai T (2000) Polymorphisms of HLA-DR and -DQ genes in Japanese patients with bullous pemphigoid. *J Dermatol* 27 (3): 149 - 156
210. Olavesen MG, Hampe J, Mirza MM, Saiz R, Lewis CM, Bridger S, Teare D, Easton DF, Herrmann T, Scott G, Hirst J, Sanderson J, Hodgson SV, Lee J, MacPherson A, Schreiber S, Lennard-Jones JE, Curran ME, Mathew CG (2000) Analysis of single-nucleotide polymorphisms in the interleukin-4 receptor gene for association with inflammatory bowel disease. *Immunogenetics* 51 (1): 1 - 7
211. Orion E, Matz H, Wolf R (2004) Pemphigus vulgaris induced by radiotherapy. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 18 (4): 508 - 509
212. Oskeritzian CA, Wang Z, Kochan JP (1999) Recombinant human (rh)IL-4-mediated apoptosis and recombinant human IL-6-mediated protection of recombinant human

stem cell factor-dependent human mast cell derived from cord blood mononuclear cell progenitors. *J Immunol* 163: 5105 - 5115

213. Pan PY, Rothman P (1999) IL-4 receptor mutations. *Curr Opin Immunol* 11: 615 - 620
214. Park MS, Terasaki PI, Ahmed AR, Tiwari JL (1979) HLA-DRw4 in 91% of Jewish pemphigus vulgaris patients. *Lancet* 2: 441 - 442
215. Parodi A, Rebora A (1992) Serum IgE antibodies bind to the epidermal side of the basement membrane zone splits in bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 126: 526 - 527
216. Pas HH, Jong MCJM de, Jonkman MF, Heeres K, Slijper-Pal IJ, Meer JB van der (1995) Bullous pemphigoid: serum antibody titre and antigen specificity. *Exp Dermatol* 4: 372 - 376
217. Pastan I, Fitzgerald D (1991) Recombinant toxins for cancer treatment. *Science (Wash. DC)* 254: 1173 - 1177
218. Paul WE (1991) Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 77: 1859 - 1870
219. Paul WE, Seder RA (1994) Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76: 241 - 251
220. Pereyo NG, Davis LS (1995) Generalized bullous pemphigoid controlled by tetracycline alone. *J Am Acad Dermatol* 32: 138 - 139
221. Pfau A, Hohenleutner U, Hohenleutner S, Eckert F, Landthaler M (1994) UV-A-provoked Localized Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 74: 314 - 316
222. Piccoli GB, Quarello F, Salomone M (1995) Are serum albumin and cholesterol reliable outcome markers in elderly dialysis patients? *Nephrol Dial Transplant* 10: 72 - 77
223. Pritchard MA, Baker E, Whitmore SA, Sutherland GR, Idzerda RL, Park LS, Cosman D, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG (1991) The interleukin-4 receptor gene (IL4R) maps to 16p11.2-16p12.1 in human and to the distal region of mouse chromosome 7. *Genomics* 10 (3): 801 - 806

224. Rico MJ, Benning C, Weingart ES, Streilein RD, Hall R III (1999) Characterization of skin cytokines in bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 140: 1079 - 1086
225. Rizzo C, Fotino M, Zhang Y, Chow S, Spizuoco A, Sinha AA (2005) Direct characterization of human T cells in pemphigus vulgaris reveals elevated autoantigen-specific Th2 activity in association with active disease. *Clin Exp Dermatol* 30 (5) 535 - 540
226. Romagnani S (1994) Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 12: 227 - 257
227. Rosa-Rosa L, Zimmermann N, Bernstein JA, Rothenberg ME, Khurana-Hershey GK (1999) The R576 IL-4 receptor alpha allele correlates with asthma severity. *J Allergy Clin Immunol* 104 (5): 1008 - 1014
228. Rose E, Wever S, Zillikens D, Linse R, Hausteil UF, Brocker EB (2005) Intravenous dexamethasone-cyclophosphamide pulse therapy in comparison with oral methylprednisolone-azathioprine therapy in patients with pemphigus: results of a multicenter prospectively randomized study. *J Dtsch Dermatol Ges* 3 (3): 200 - 206
229. Roses AD (2000) Pharmacogenetics and the practise of medicine. *Nature* 405: 857 - 865
230. Rosina P, Chierigato C, D'Onghia FS (1996) Bullous pemphigoid and diabetes mellitus. *Acta Derm Venereol* 76 : 497 - 498
231. Roujeau JC, Guillaume JC, Morel P, Crickx B, Dalle E, Doutre MS, Guillot B, Godard W, Gorin L, Labeille B (1984) Plasma exchange in bullous pemphigoid. *Lancet* 2: 486 - 489
232. Roujeau JC, Lok C, Bastuji-Garin S, Mhalla S, Enginger V, Bernard P (1998) High risk of death in elderly patients with extensive bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 134: 465 - 469
233. Ruocco V, Brenner S, Lombardi ML (1996) A Case of Diet-Related Pemphigus. *Dermatology* 192: 373 - 374

234. Rzany B, Danckwardt C, Jung M, Schuhmann M, Messer G, Bayerl C (2000) Erhöhtes Risiko von Malignomerkrankungen bei Patienten mit Bullösem Pemphigoid. *Akt Dermatol* 26: 52 - 59
235. Rzany B, Partscht K, Jung M, Kippes W, Mecking D, Baima B, Prudlo C, Pawelczyk B, Messmer EM, Schuhmann M, Sinkgraven R, Büchner L, Büdinger L, Pfeiffer C, Sticherling M, Hertl M, Kaiser HW, Meurer M, Zillikens D, Messer G (2002) Risk Factors for Lethal Outcome in Patients With Bullous Pemphigoid. *Arch Dermatol* 138: 903 - 908
236. Sami N, Bhol KC, Ahmed RA (2003) Influence of intravenous immunoglobulin therapy on autoantibody titers to desmoglein 3 and desmoglein 1 in pemphigus vulgaris. *Eur J Dermatol* 13 (4): 377 - 381
237. Sams WM, Gammon WR (1982) Mechanism of lesion production in pemphigus and pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 6: 431 - 449
238. Savin JA (1979) The events leading to the death of patients with pemphigus and pemphigoid. *Br J Dermatol* 101: 521 - 534
239. Sayama K, Yonehara S, Watanabe Y, Miki Y (1994) Expression of Fas antigen on keratinocytes in vivo and induction of apoptosis in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 103: 330 - 334
240. Schaller J, Feleke W, Haustein UF, Baldauf C, Kunze G (1991) HLA in bullous pemphigoid. The probable role of HLA-B7 as a marker for poor responders to immunosuppressive therapy. *Intern J Dermatol* 30: 36 - 38
241. Schmidt E, Ambach A, Bastian B, Bröcker EB, Zillikens D (1996) Elevated levels of interleukin-8 in blister fluid of bullous pemphigoid compared with suction blisters of healthy controls. *J Am Acad Dermatol* 34: 310 - 312
242. Schmidt E, Bastian B, Dummer R, Tony HP, Bröcker EB, Zillikens D (1996) Detection of elevated levels of IL-4, IL-6, and IL-10 in blister fluid of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res* 288: 353 - 357
243. Schmidt E, Bröcker EB, Zillikens (2000) Neue Aspekte zur Pathogenese des Bullösen Pemphigoids. *Hautarzt* 51: 637 - 645

244. Schmidt E, Bröcker EB, Zillikens D (1995) High levels of soluble CD23 in blister fluid of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 131: 966 - 967
245. Schmidt E, Bröcker EB, Zillikens D (2000) Pemphigus. *Hautarzt* 51: 309 - 318
246. Schmidt E, Hunzelmann N, Zillikens D, Brocker EB, Goebeler M (2006) Rituximab in refractory autoimmune bullous diseases. *Clin Exp Dermatol* 31 (4): 503 - 508
247. Schmidt E, Klinker E, Opitz A, Herzog S, Sitaru C, Goebeler M, Mansouri Taleghoni B, Brocker EB, Zillikens D (2003) Protein A immunoabsorption: a novel and effective adjuvant treatment of severe pemphigus. *Br J Dermatol* 148 (6): 1222 - 1229
248. Schmidt E, Kraensel R, Goebeler M, Sinkgraven R, Brocker EB, Rzany B, Zillikens D (2005) Treatment of bullous pemphigoid with dapsone, methylprednisolone, and topical clobetasol propionate: a retrospective study of 62 cases. *Cutis* 76 (3): 205 - 209
249. Schmidt E, Mitnacht A, Schömig H, Dummer R, Bröcker EB, Zillikens D (1996) Detection of IL-1 α , IL-1 β and IL-1 receptor antagonist in blister fluid of bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 11: 142 - 147
250. Schmidt E, Skrobek C, Kromminga A, Hashimoto T, Messer G, Bröcker EB, Yancey KB, Zillikens D (2001) Cicatricial pemphigoid: IgA and IgG autoantibodies target epitopes on both intra- and extracellular domain of bullous pemphigoid antigen 180. *Br J Dermatol* 145: 778 - 783
251. Sebzda E, Mariathasan S, Ohteki T, Jones R, Bachmann MF, Ohashi PS (1999) Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 17: 829 - 874
252. Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas S de, Groth B (1992) The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4⁺ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 176: 1091 - 1098
253. Selby L, de Castro F, de Villiers WJ (2004) The association of bullous pemphigoid and ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 49 (11 - 12): 1768 - 1770
254. Shieh S, Fang YV, Becker JL, Holm A, Beutner EH, Helm TN (2004) Pemphigus, pregnancy, and plasmapheresis. *Cutis* 73 (5): 327 - 329

255. Shirakata Y, Shiraishi S, Sayama K, Miki Y (1990) Subclass Characteristics of IgG Autoantibodies in Bullous Pemphigoid and Pemphigus. *J Dermatol* 17: 661 - 666
256. Shirakawa T, Deichmann KA, Izuhara K, Mao XQ, Adra CN, Hopkin JM (2000) Atopy and asthma genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling. *Immunol Today* 21 (2): 60 - 64
257. Simon DG, Krutchkoff D, Kaslow RA, Zarbo R (1980) Pemphigus in Hartford County, Connecticut, from 1972 to 1977. *Arch Dermatol* 116: 1035 - 1037
258. Skurkovich B, Skurkovich S (2003) Anti-interferon-gamma antibodies in the treatment of autoimmune diseases. *Curr Opin Mol Ther* 5 (1): 52 - 57
259. Smolle J (1985) Zur Therapie der Pemphiguserkrankungen. *Hautarzt* 36: 96 - 102
260. Stanley JR (1993) Cell adhesion molecules as targets of autoantibodies in pemphigus and pemphigoid, bullous diseases due to defective epidermal cell adhesion. *Adv Immunol* 53: 291 - 325
261. Stanley JR, Hawley-Nelson P, Yuspa SH, Shevach EM, Katz SI (1981) Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified epithelia. *Cell* 24: 897 - 903
262. Stein LF, Saed GM, Fivenson DP (1997) T-cell cytokine network in cutaneous lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol* 37: 191 - 196
263. Stockman A, Beele H, Vanderhaeghen Y, Naeyaert JM (2004) Topical class I corticosteroids in 10 patients with bullous pemphigoid: correlation of the outcome with the severity degree of the disease and review of literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 18 (2): 164 - 168
264. Sun CC, Wu J, Wong TT, Wang LF, Chuan MT (2000) High levels of interleukin-8, soluble CD4 and soluble CD8 in bullous pemphigoid blister fluid. The relationship between local cytokine production and lesional T-cell activities. *Br J Dermatol* 143: 1235 - 1240
265. Suarez-Fernandez R, Longo I, Aviles JA, Bueno C, Rodriguez-Mahou M, Lazaro P (2006) Intravenous immunoglobulin therapy: ELISA measurement of antidesmogleins 1 and 3 in three patients with pemphigus vulgaris. *Rev Clin Esp* 206 (10): 499 - 503

266. Taguchi T, McGhee JR, Coffman RL, Beagley KW, Eldridge JH, Takatsu K, Kiyono H (1990) Detection of individual mouse splenic T cells producing IFN-gamma and IL-5 using the enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. *J Immunol Methods* 128: 65 - 73
267. Tallab T, Joharji H, Bahamdan K, Karkashan E, Mourad M, Ibrahim K (2001) The incidence of pemphigus in the southern region of Saudi Arabia. *Int J Dermatol* 40 (9): 570 - 572
268. Tanaka Y, Delaporte E, Dubucquoi S, Gounni AS, Porchet E, Capron A, Capron M (1994) Interleukin-5 messenger RNA and immunoreactive protein expression by activated eosinophils in lesional atopic dermatitis skin. *J Invest Dermatol* 103: 589 - 592
269. Taylor G, Venning V, Wojnarowska F, Welch K (1993) Bullous pemphigoid and autoimmunity. *J Am Acad Dermatol* 29 (2): 181 - 183
270. Thoma-Uszynski S, Uter W, Schwietzke S, Hofmann SC, Hunziker Z, Bernhard P, Treudler R, Zouboulis CC, Schuler G, Borradori L, Hertle M (2004) BP230- and BP180-specific auto-antibodies in bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 122 (6): 1413 - 1422
271. Tremeau-Martinage C, Bazek J, Oksman F (1995) Immunoglobulin G subclass distribution of anti-intercellular substance antibodies in pemphigus (in French). *Ann Dermatol Venerol* 122: 409 - 411
272. Uckun FM (1993) Immunotoxins for the treatment of leukemia. *Br J Haematol* 85: 435 - 438
273. Venning VA, Whitehead PH, Leigh JM, Allen J, Wojnarowska F (1991) The clinical expression of bullous pemphigoid is not determined by the specificity of the target antigen. *Br J Dermatol* 125: 561 - 565
274. Venning VA, Wojnarowska F (1992) Lack of predictive factors for the clinical course of bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 26: 585 - 589
275. Venning VA, Wojnarowska F (1995) Induced bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 132: 831 - 832

276. Verjans GMGM, Messer G, Weiß EH, and der Linden SM, Kijlstra A (1992) Polymorphism of the tumor necrosis factor region in relation to diseases: an overview. *Rheum Dis Clin of North America*; 18: 177 - 185
277. Vitetta ES, Fulton RJ, May RD, Till M, Uhr JM (1988) Redesigning nature's poisons to create antitumor reagents. *Science (Wash. DC)* 238: 1098 - 1101
278. Vitetta ES, Ohara J, Myers CD, Layton JE, Krammer PH, Paul WE (1985) Serological, biochemical, and functional identity of B cell-stimulatory factor 1 and B cell differentiation factor for IgG1. *J Exp Med* 162: 1726 - 1731
279. Walker DC, Kolar KA, Hebert AA, Jordon RE (1995) Neonatal Pemphigus Foliaceus. *Arch Dermatol* 131: 1308 - 1311
280. Wang HY, Shelburne CP, Zamorano J, Kelly AE, Ryan JJ, Keegan AD (1999) Cutting edge: effects of an allergy-associated mutation in the human IL-4R alpha (Q576R) on human IL-4-induced signal transduction. *J Immunol* 162 (8): 4385 - 4389
281. Weller R, White MI (1996) Bullous pemphigoid and penicillamine. *Clin Exp Dermatol* 21: 121 - 122
282. William DS (2004) Pemphigus. *J Insur Med* 36 (3): 267 - 268
283. Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LBA, Duff GW (1993) An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8 and DR3 alleles. *J Exp Med* 177: 577 - 560
284. Wilson AG, Symons JA, Mc Dowell TL, McDevitt HO, Duff GW (1997) Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad USA* 94: 3195 - 3199
285. Wjst M, Kruse S, Illig T, Deichmann K (2002) Asthma and IL-4 receptor alpha gene variants. *Eur J Immunogenet* 29 (3): 263 - 268
286. Wolf R, Brenner S (1994) An active amide group in the molecules of drugs that induce pemphigus: a casual or causal relationship? *Dermatologica* 189: 1 - 4

287. Woodroffe MN, Cuzner ML (1993) Cytokine mRNA expression in inflammatory multiple sclerosis lesions: detection by non-radioactive in situ hybridisation. *Cytokine* 5 (6): 583 - 588
288. Wucherpfennig KW, Yu B, Bhol K, Monos DS, Argyris E, Karr RW, Ahmed AR, Strominger JL (1995) Structural basis for major histocompatibility complex (MHC)-linked susceptibility to autoimmunity: charged residues of a single MHC binding pocket confer selective presentation of self-peptides in pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11935 - 11939
289. Xia HZ, Du Z, Craig S (1997) Effect of recombinant human IL-4 on tryptase, chymase, and Fc epsilon receptor type I expression in recombinant human stem cell factor-dependent fetal liver-derived human mast cells. *J Immunol* 159: 2911 - 2921
290. Yin T, Tsang MLS, Yang YC (1994) Jak1 kinase forms complexes with interleukin-4 receptor and 4PS/Insulin receptor substrate-1-like protein and is activated by interleukin-4 and interleukin-9 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 269: 26614 - 26617
291. Ying S, Humbert M, Barkans J, Corrigan CJ, Pfister R, Menz G, Larche M, Robinson DS, Durham SR, Kay AB (1997) Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. *J Immunol* 158: 3539 - 3544
292. Youle RJ (1996) Immunotoxins for central nervous system malignancy. *Cancer Biol* 7: 65 - 70
293. Youn J, Hwang SH, Cho CS (2000) Association of the interleukin-4 receptor alpha variant Q576R with the Th1/Th2 imbalance in connective tissue disease. *Immunogenetics* 51: 743 - 746
294. Zentner A, Rendl J, Grelle I, Dummer R, Bröcker EB, Zillens D (1994) Elevated levels of tumor necrosis factor receptor I in blister fluids of bullous pemphigoid and suction blisters. *Arch Dermatol Res* 286: 355 - 357
295. Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, Raus J, Weiner HL, Hafler DA (1994) Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic pro-

- tein and proteolipid in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 179: 973 - 984
296. Zillikens D (1999) Acquired skin disease of hemidesmosomes. *J Dermatol Sci* 20: 134 - 154
297. Zillikens D, Bröcker E-B (1994) Paraneoplastischer Pemphigus. *Hautarzt* 45: 827 - 833
298. Zillikens D, Giudice GJ, Diaz LA (1996) Bullous pemphigoid. An autoimmune blistering disease of the elderly. *J Geriatr Dermatol* 4: 35 - 41
299. Zillikens D, Mascaro JM, Rose PM, Liu Z, Ewing SM, Caux F, Hoffmann RG, Diaz LA, Giudice GJ (1997) A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 109: 679 - 683
300. Zillikens D, Rose PA, Balding SD, Liu Z, Olague-Marchan M, Diaz LA, Giudice GJ (1997) Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. *J Invest Dermatol* 109: 573 - 579
301. Zillikens D, Schuessler M, Dummer R, Porzolt F, Hartmann AA, Burg G (1992) Tumor necrosis factor in blister fluids of bullous pemphigoid. *Eur J Dermatol* 2: 429 - 431
302. Zillikens D, Wever S, Roth A, Weidenthaler Barth B, Hashimoto T, Bröcker EB (1995) Incidence of autoimmune subepidermal blistering diseases in a region of central Germany. *Arch Dermatol* 131: 957 - 958
303. Zinkernagel RM, Doherty PC (1974) Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248: 701 - 702

7.2 Abkürzungen

A	Ampère
BMZ	Basalmembranzone
BP	Bullöses Pemphigoid
bp	Basenpaar(e)
BSD-Gruppe	“Bullous skin disease”-Studiengruppe
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
h	Stunde
HLA	Humane Leukozytenantigene
IL	Interleukin
M	Mol(arität)
min	Minute
n	Anzahl
PBS	Phosphat-Saline-Puffer (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PV	Pemphigus vulgaris
r/min	Umdrehungen (<i>rounds</i>)/Minute
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
SSCP	<i>Single stranded DNA conformation polymorphism</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Th-Zellen	T-Helfer-Lymphozyten Typ 2 und Typ 1 (Th1- und Th2-Zellen)
U	Einheit (<i>Unit</i>)
UV	Ultraviolette Strahlung

7.3 Materialliste

7.3.1 Reagenzien und chemische Substanzen

10 x PCR Buffer (ohne MgCl ₂)	Perkin Elmer, Heidelberg
Acrylamid	Bio-Rad, München
Agarose High EEO Research Grade	Serva, Heidelberg
Agarose High Strength Analytical Grade	Bio-Rad, München
Ammoniumchlorid NH ₄ Cl	E. Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (10%-Lösung)	Sigma, Deisenhofen
Borsäure H ₃ BO ₃	C. Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau, Na-Salz	Serva, Heidelberg
DNAzol reagent (Guanidine-Isocyanate)	Gibco, Karlsruhe
EDTA, Triplex ® III	E. Merck, Darmstadt
Essigsäure CH ₃ COOH	C. Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut	E. Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-Ethyl- 5-Phenylphenanthridiumbromid)	Sigma, Deisenhofen
Ficoll 400	Sigma, St. Louis, USA
Formaldehyd	C. Roth, Karlsruhe
Formamid deionisiert	C. Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat	E. Merck, Darmstadt
Längenstandard „1-kb-Leiter“	Gibco BRL Life Technologies, Paisley, Schottland
Low Range A 20 bp-DNA-Leiter	Peqlab, Erlangen

MgCl ₂ -Solution, 25 mM	Perkin Elmer, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin (Temed)	E. Merck, Darmstadt
Natriumborhydrid NaBH ₄	Sigma, Deisenhofen
Natriumcarbonat Na ₂ CO ₃	E. Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid NaOH	C. Roth, Karlsruhe
Nucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2 mM	Pharmacia, Freiburg
Orange G	Sigma, St. Louis, USA
Peq Gold, 100 bp-DNA-Leiter	Peqlab, Erlangen
Piperazindiacrylamid	Bio-Rad, München
Primer IL-4R 1665s	
5' - CCG AAA TGT CCT CCA GCA TG - 3'	MWG-Biotech, Ebersberg
Primer IL-4R 1820as	
5' – GAG AAG GCC TTG CCA GC – 3'	MWG-Biotech, Ebersberg
Schwefelsäure H ₂ SO ₄	C. Roth, Karlsruhe
Silbernitrat AgNO ₃	Sigma, Deisenhofen
Taq DNA Polymerase, 270799, lot: 6818, 250u, 5U/μl	Amersham Biotech, Freiburg
Tris reinst	C. Roth, Karlsruhe

7.3.2 Geräte und technische Hilfsmittel

Gel bonds 124 x 258 mm, 50 Stück	Amersham Biotech, Freiburg
Gelcassette bestehend aus:	
Flexi Clamps, 6 Stück	Amersham Biotech, Freiburg
Glass plate 260 x 125 x 0,5 mm U-frame	Amersham Biotech, Freiburg
Glass plate 260 x 125 x 3 mm	Amersham Biotech, Freiburg
High Pure PCR Product Purification Kit	Boehringer, Mannheim
Multiphor II Elektrophoresis Unit 2117	Pharmacia Biotech, Freiburg
Power supply LKB Bromma 2197	Pharmacia Biotech, Freiburg

PCR-Cycler Gene Amp PCR-system 9600	Perkin Elmer, Heidelberg
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Sample application pieces, 200 Stück	Amersham Biotech, Freiburg
Spektrophotometer LE 1020	Cecil Instruments, Cambridge
UV-Transilluminator (Wellenlänge 312 nm)	Bachofer, Reutlingen

7.3.3 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

1-kb-Leiter (20ng/μl): 15 μl Molekulargewichtsstandardlösung
 200 μl 6 x Auftragspuffer
 535 μl deionisiertes Wasser

6 x Auftragspuffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5
 2 mM EDTA
 20% (v/v) Ficoll 400
 0,4% (w/v) Orange G

10 x TBE-Puffer: 890 mM Tris reinst
 890 mM Borsäure
 20 mM EDTA
 pH-Einstellung auf 8,0

Erylysepuffer: 155 mM NH₄Cl
 10 mM KHCO₃
 1 mM EDTA

PBS: 139,9 mM NaCl
 2,7 mM KCl

10,1 mM Na₂HPO₄

1,8 mM KH₂PO₄

pH-Einstellung auf 7,4

Polyacrylamidgel:

3 ml Tris-Sulfat-Puffer

4 ml 29,1% Acrylamid- 0,9% Piperazindiacrylamid

5,5 µl Temed

105 µl APS 10%

Tris-Borat-Puffer:

0,5 M Tris

0,14 M Borsäure

pH-Einstellung auf 9,0

Tris-Sulfat-Puffer (200 ml): 140 ml Aqua dest.

0,43 ml H₂SO₄

ca. 9 g Tris reinst zur pH-Einstellung auf 9,0

7.4 Studienrelevante Fragebogensätze

7.4.1 Patienten- und Quellenidentifikation

Identifikationsnummer:

1 Erfassungszentrum

1 = Dresden, 2 = Mannheim, 3 = München, 4 = Bonn,

5 = Aachen, 6 = Würzburg, 7 = Kiel

2 Interviewer

1 = ..., 2 = ..., 3 = ... (jeweils pro Zentrum vergeben)

Name des Interviewers

3-6 Fortlaufende Nummer

(werden fortlaufend pro Zentrum vergeben)

Initialen Vorname: ;, Initialen Nachname:

Fall / Kontrolle : 1 = Fall, 2 = Kontrolle

wenn Kontrolle (2), dann bitte Interviewnummer des Falles angeben: ID

Die folgenden Informationen, die der Identifikation des Patienten dienen, sind nicht für die Dateneingabe bestimmt!

Name des Patienten : _____, Vorname: _____

Geburtsdatum : ..

Geburtsort : _____, PLZ:

Adresse

Straße, Nr. : _____

PLZ : (PLZ alt:)

Ort : _____

Telefon : _____ FAX: _____

Behandelnder Arzt 1 (Name): : _____

Fachrichtung : 1 = Derma, 2 = Hausarzt, 3 = Sonstiges: _____, 9 = nicht bekannt

Adresse

Straße, Nr. : _____

PLZ : (PLZ alt:)

Ort : _____

Telefon : _____ FAX: _____

Behandelnder Arzt 2 (Name): : _____

Fachrichtung : 1 = Derma, 2 = Hausarzt, 3 = Sonstiges: _____, 9 = nicht bekannt

Adresse

Straße, Nr. : _____

PLZ : (PLZ alt:)

Ort : _____

Telefon : _____ FAX: _____

Erstdiagnose Datum ..

(Frage: Wann wurde die Diagnose einer blasenbildenden Autoimmunerkrankung zum ersten Mal gestellt?)

Erstdiagnose durch wen?

1 = Hausarzt

4 = Andere Dermatologische Klinik

2 = Dermatologe niedergelassen

5 = Eigene Dermatologische Klinik

3 = Anderer Facharzt

9 = Nicht bekannt

7.4.2 Klinischer Befund bei Interview

(aus Anamnesebogen zu entnehmen, wenn möglich bitte graphisch darstellen, siehe Anlage1)

Größe : m

Gewicht : kg

- Hautbeteiligung : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt
- Capillitium : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt
- Gesicht : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt
- Stamm : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt
- Extremitäten : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt
- Distale Extremitäten betont : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt
- Hände : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt
- Füße : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt
- Nägel : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt
- Lichtexponierte Areale : 1 = ja lichtexponiert betont, 2 = nein, 3 = ausschließl. lichtexp., 9 = nicht bekannt

Maximale Ausdehnung : 1 = < 10%, 2 = 10 - 50%, 3 = > 50%, 9 = nicht bekannt

Maximale Ausdehnung in % der Kobfl. :

(diese Angaben (gilt für alle Hautveränderungen) nach der Neunerregel für Verbrennungspatienten (siehe Anlage 10.1) bestimmen)

Schleimhautbeteiligung : 1 = ja nicht narbig, 2 = nein, 3 = ja, narbig, 9 = nicht bekannt

7.4.3 Diagnosenverifizierung und Immunologisches Labor

Histopathologie : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Entnahmedatum : . .

Diagnose (nach ICD-10) : .

Diagnose (schriftlich) : _____

Eingangsnummer :

intraepidermale Blasenbildung : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

subepidermale Blasenbildung : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

dermale Eosinophilie : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Direkte Immunfluoreszenz (DIF) : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Eingangsnummer :

Entnahmedatum : . .

Diagnose schriftlich : _____

Diagnose (nach ICD-10) : . (bitte Anlage 2 verwenden)

	Vorhanden?	Verteilung?
	1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt	1 = BMZ linear, 2 = Papillenspitzen, 3 = intraepidermal, 9 = nicht bekannt
IgG	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IgM	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IgA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

C3

C4

Fibrinogen

Indirekte Standard Immunfluoreszenz (IIF): 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Eingangsnummer :

Entnahmedatum : ..

Diagnose schriftlich : _____

Diagnose (nach ICD-10) : . (bitte Anlage verwenden)

Antikörper	Vorhanden? 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt	Titer-Affe 1: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Titer-Kaninchen 1: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Titer- (undifferenziert) 1: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Pemphigus AK (Ma: Stachelzel- lAk)	<input type="checkbox"/>	1: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	1: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	1: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Pemphigoid AK (Ma: Basalmem- bran.AK)	<input type="checkbox"/>	1: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	1: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	1: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
IgA-Endomysium AK	<input type="checkbox"/>	1: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	1: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	1: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
EBA-AK	<input type="checkbox"/>	1: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	1: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	1: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

Herpes gestatio-
nis-Fakt.

1:

Immunoblot : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Datum : ..

Eingangsnummer :

Diagnose schriftlich : _____

Diagnose (nach ICD-10) : . (bitte Anlage 2 verwenden)

PV

Paraneoplastischer PV : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Desmoglein 1 (PF) : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Desmoglein 3 (PV) : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

BP

BP 180NC16A : 0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = positiv, 3 = stark positiv, 9 =
nicht

bekannt

BP 180 : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

BP 230 : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Andere Laborparameter (alle zu Beginn des stationären Aufenthaltes)

BKS : /

Eosinophile : % (oder in K/ul)?

CRP :

CEA : g/l

Na : mmol/l

Albumin : g/l

Gesamteiweiß :

Glucose : (1) , (2) ,

: (3) mg/dl

Bitte hier die ersten drei Glucosewerte eintragen! - nicht das BZ-Tagesprofil -

Kreatinin : mg/dl

gamma GT : U/l

GPT (ALAT) : U/l

GOT (ASAT) : U/l

Hämokult : 1 = positiv, 2 = negativ

7.4.4 Demographische Daten

Geschlecht : 1 = männlich, 2 = weiblich, 9 = nicht bekannt

Wie ist der Patient versichert :

1 = privat, 2 = Kasse, 3 = Sozialamt, 4= Andere _____, 9
= nicht bekannt

Ethnische Gruppe:

1 = Kaukasier / Europäer

4 = Andere

2 = Afrikaner

Spezifizieren: _____

3 = Asiaten

Herkunftsland :

1 = Deutschland

8 = England

2 = Türkei

9 = Rußland

3 = Italien

10 = Andere Länder der ehemaligen Sowjetunion

4 = Ehem. Jugoslawien

Spezifizieren: _____

5 = Spanien

6 = Portugal

11 = Israel

7 = Frankreich

12 = Andere _____

7.4.5 Fragen zu Risikofaktoren

(Bitte unbedingt das Datum der Diagnose angeben damit eindeutig wird, ob das Ereignis vor oder nach Beginn der Hautreaktion aufgetreten ist)

Malignome

Bitte hier keine Basaliome und spinozelluläre Karzinome eintragen!

Erst-Malignom

1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Diagnose: _____

ICD-10 Kodierung : □□□.□

Datum (Jahr der Diagnose) : □□□□

Zweit-Malignom 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Diagnose: _____

ICD-10 Kodierung : □□□.□

Datum (Jahr der Diagnose) : □□□□

Andere Erkrankungen:

Diagnose		Datum (Jahr der Diagnose)
Diabetes mellitus	<input type="checkbox"/>	□□□□
	1 = Typ 1, 2 = Typ 2, 3 = nein, 9 = nicht bekannt	
Rheumatoide Arthritis	<input type="checkbox"/>	□□□□
	1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt	
Zoeliakie	<input type="checkbox"/>	□□□□
	1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt	
Colitis ulcerosa	<input type="checkbox"/>	□□□□
	1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt	

Thyreoiditis Hashimoto 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht be-
kannt

Sjögren Syndrom 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Vitiligo 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

And. Autoimmunerkrankung: 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

ICD-10 .

Multiple Sklerose

1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Rhinitis allergica

1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Atopisches Ekzem

1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Asthma bronchiale

1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Hypertonie

1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Koronare Herzerkrankung

1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Lebererkrankungen:

1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

ICD-10 .

Nierenerkrankungen

_____ 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

ICD-10 .

Diagnostik:

Oberbauchsonographie : 1 = ja, 2 = nein, 3 = nicht beurteilbar, 9 = nicht bekannt

Malignom : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Röntgen Thorax : 1 = ja, 2 = nein, 3 = nicht beurteilbar, 9 = nicht bekannt

Malignom : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Knochendichtemessung : % der Altersnorm

(Quantitatives CT oder Knochendensitometrie)

Fragen zu Virusinfektionen: (Hatten Sie in dem Jahr vor Beginn der Hautreaktion eine Infektion mit)

Herpes simplex : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Wenn ja, wann zuletzt: : .. (vor Beginn der Hautreaktion)

Haben Sie rezidivierenden Herpes simplex : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Varicella zoster virus : 1 = ja, Windpocken, 2 = ja, Gürtelrose, 3 = beides, 4 = nein, 9 = nicht bekannt

Wenn ja, wann zuletzt: : .. (vor Beginn der Hautreaktion)

Fragen zu anderen Infektionen:

(Hatten Sie in dem Jahr vor Beginn der Hautreaktion andere Infektionen? - Bitte mit der Infektion beginnen die zuletzt aufgetreten ist)

1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Wenn ja, bitte spezifizieren:

Infektion 1: _____ ICD-10 .

Datum des Auftretens: : .. (vor Beginn der Hautreaktion)

Infektion 2: _____ ICD-10 .

Datum des Auftretens: : .. (vor Beginn der Hautreaktion)

Infektion 3: _____ ICD-10 .

Datum des Auftretens: : .. (vor Beginn der Hautreaktion)

Die folgenden Fragen gehen über das letzte Jahr hinaus:

(Hatten Sie jemals)

Hepatitis Virus : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Wenn ja, welche(s) : (Bitte Buchstaben, maximal zwei eingeben)

Wenn ja, wann : .. (vor Beginn der Hautreaktion)

HIV : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

Stadium : (Bitte Buchstabe und Zahl, z.B. A1 eingeben)

Wenn ja, wann : .. (vor Beginn der Hautreaktion)

Andere Risikofaktoren:

Radiatio : 1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt

(Ist bei Ihnen jemals eine Bestrahlungstherapie durchgeführt worden?)

Datum der letzten Bestrahlung : ..

Wegen welcher Diagnose? : _____

ICD-10 Kodierung : .

7.4.6 Fragen zu Haustieren

Haben Sie Haustiere, die mit Ihnen in der Wohnung leben?

1 = ja, 2 = nein, 3 = nicht bekannt

wenn ja:

Welche Haustiere leben mit Ihnen zusammen?

7.4.7 Therapie bei Entlassung

Welche Therapie wurde während des stationären Aufenthaltes und bei Entlassung durchgeführt?

Hier muß gezielt nach Glucocorticosteroiden, Immunsuppressiva (Azathioprin, Cyclophosphamid) u.a. gefragt werden.

Arzneimittel	1 = ja, 2 = nein, 9 = nicht bekannt	höchste Dosis	Dosierung bei Entlassung
Glucocorticosteroide*	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<hr/>			
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> (Code)			
Azathioprin	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Cyclophosphamid	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Methotrexat	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Mycophenolat Mofetil	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Dapson	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Antibiotika	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<hr/>			
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> (Code)			
Antibiotika	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<hr/>			
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> (Code)			
Antibiotika	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

□□□□□□(Code)

* Die Dosierung muß in Prednisolonäquivalent umgerechnet werden!

7.4.8 Patienteninformation und Einverständniserklärung

Patienteninformation und Einverständniserklärung

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

bei Ihnen wurde eine blasenbildende Hauterkrankung diagnostiziert. Blasenbildende Hauterkrankungen, wie z.B. das bullöse Pemphigoid und der Pemphigus vulgaris gehören zu den Autoimmunerkrankungen, d.h. den Erkrankungen bei denen der eigene Körper gegen sich selbst reagiert. Obwohl wir schon viel über diese Erkrankungen wissen, besteht noch Unkenntnis darüber, welche Faktoren diese Erkrankungen auslösen können.

Zur Zeit führen wir in Zusammenarbeit mit mehreren anderen deutschen Universitätskliniken eine Studie zu diesen Hauterkrankungen durch. Ziel dieser gemeinsamen Studie ist es, genaue Zahlen zur Häufigkeit sowie Informationen zur Entstehung dieser Hauterkrankungen und der Faktoren die den Verlauf dieser Erkrankungen beeinflussen zu erhalten.

Wir würden Sie deshalb gerne befragen, so wie ergänzend Blut und Gewebe für weitere Untersuchungen entnehmen.

Im Rahmen der klinischen Prüfung werden Ihre Daten/ Krankheitsdaten einschließlich der Daten über Geschlecht, Alter, Gewicht und Körpergröße anonymisiert aufgezeichnet (ohne Namensnennung) und zum Zwecke der wissenschaftlichen Auswertung der Studie archiviert.

Im Falle der Veröffentlichung der Studienergebnisse bleibt Vertraulichkeit Ihrer persönlichen Daten gewährleistet

Die Beachtung des Bundesdatenschutzgesetzes ist in vollem Umfang sichergestellt.

Ich erkläre mich bereit an dieser Studie teilzunehmen, und stimme der Befragung zu. Weiterhin bin ich damit einverstanden, daß meine Krankenunterlagen zur Einsicht hinzugezogen werden können. Falls eine Probeentnahme der Haut durchgeführt wurde bin ich einverstanden, daß die mikroskopischen Präparate zur Beurteilung hinzugezogen werden. Ich bin auch damit einverstanden, daß weitere Untersuchungen die dem Verständnis dieser Hauterkrankungen dienen an Blut und Gewebebestandteilen durchgeführt werden. Ich bin einverstanden, daß meine Krankheitsdaten anonymisiert aufgezeichnet werden.

Den Inhalt der vorliegenden Einwilligungserklärung habe ich verstanden; mit der vorstehend geschilderten Vorgehensweise bin ich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift des aufkl. Arztes

Unterschrift des Patienten

* bullous skin diseases = blasenbildender Hauterkrankungen

7.5 Lebenslauf

7.5.1 Daten zur Person

Name: Martin

Vornamen: Stefanie Elisabeth

Geburtsdatum: 10.03.1976

Geburtsort: Landshut

Eltern: Ulrich Martin, Sonderschulleiter, verstorben am 09.11.2005
Margit Martin, geb. Aurbach, Sonderschulfachlehrerin

Geschwister: Ulrike Kainz, geb. Martin, Sonderschullehrerin

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Adresse: Greineckerstrasse 2
81379 München

Telefon: 089/715579

E-Mail: stefanie.e.martin@freenet.de

7.5.2 Schulbildung

1982 – 1986 Karl-Heiß-Grundschule Landshut

1986 – 1995 Hans-Carossa-Gymnasium (humanistisch-neusprachlich) Landshut
dort Abitur auf dem neusprachlichen Zweig mit den Leistungskursen
Deutsch und Englisch und zusätzlichen Abiturfächern Mathematik
und Sozialkunde

7.5.3 Studium

11/96 – 03/97	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität
04/97 – 05/04	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
04/03 – 03/04	Praktisches Jahr <ol style="list-style-type: none">1. Terzial: Innere Medizin im KKH Harlaching (4. Med, Onkologie)2. Terzial: Pädiatrie im Dr. von Hauner'schen Kinderspital3. Terzial: Chirurgie im KKH Dritter Orden

7.5.4 Studienbegleitende Tätigkeiten

Famulaturen

03/00 – 04/00	Orthopädische Klinik St. Vincentius Konstanz
09/01 – 10/01	Pädiatrische Praxis Dr. med. G. Kilian-Kornell Starnberg
03/01	Innere Medizin (Pneumologie) und Allergologie Hochgebirgsklinik Davos-Wolfgang
03/02	Klinik für Neonatologie Champus Charité Mitte, Berlin

Nebentätigkeit

01/00 – 08/02	wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Arbeits- und Umweltmedizin der LMU bei Dr. Schierl
---------------	---

7.5.5 Klinische Tätigkeiten als Ärztin

08/04 – 10/04	ÄiP im Cardio-MR am Krankenhaus Agathried, Hausam
10/04 – 08/05	Assistenzärztin im Cardio-MR am Krankenhaus Agatharied, Hausam
seit 08/05	Assistenzärztin in der Inneren Medizin am Krankenhaus Agatharied, Hausham

7.5.6 Publikationen im Rahmen der Dissertation

02/02	Martin S, Rzany B, Messer G et al.: Towards a diagnostic chip for genetic susceptibility of autoimmune bullous diseases. Poster auf der 29. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF) vom 28.02.2002 – 02.03.2002 in Berlin
05/07	Weisenseel P, Martin S, Partscht K, Messer G, Prinz JC (2007) Relevance of the low-affinity type of the Fcγ-receptor IIIa-polymorphism in bullous pemphigoid. Arch Dermatol Res. 299 (3): 163-164

7.6 Danksagung

Mein Dank gilt

- Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Gerd Plewig, ehemals Direktor der Dermatologischen Klinik und Poliklinik, Klinikum der Universität München, und dessen Nachfolger Prof. Dr. med. Dr. h. c. Thomas Ruzicka für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes unter PD Dr. Gerald Messer und die Ermöglichung der Studie und Promotion
- Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß, Institut für Anthropologie und Humangenetik der Ludwig-Maximilians-Universität München, und deren Mitarbeitern für die Möglichkeit der gesamten Durchführung des experimentellen Teils in ihrer Arbeitsgruppe, die Überlassung der technischen Geräte und die Betreuung
- den Mitgliedern der Arbeitsgruppe BSD unter der Leitung von Herrn PD Dr. Berthold Rzany, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie Universitätsklinikum Charité Berlin Mitte (dEMB), für die Unterstützung der Studie und die Ermöglichung der Teilnahme an Arbeitsgruppentreffen
- und nicht zuletzt allen Patienten, die sich bereit erklärt haben, an dieser Studie teilzunehmen.