

Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und
Venerologie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. D. Zillikens

**Untersuchungen zur Sensitivität der direkten
Immunfluoreszenz und der Immunhistochemie in der
Diagnostik des Schleimhautpemphigoids**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Julia Marie Nitz
aus Bad Segeberg

Lübeck 2018

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Iakov Shimanovich

2. Berichtstatterin: Prof. Dr. med. Verena-Wilbeth Sailer

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2019

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 09.07.2019

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Bullöse Autoimmundermatosen	1
1.2 Schleimhautpemphigoid.....	2
1.2.1 Klinik	2
1.3 Diagnostik des Schleimhautpemphigoids	4
1.3.1 Direkte Immunfluoreszenz	5
1.3.2 Immunhistochemie.....	6
1.3.3 Immunserologie	7
1.3.3.1 Zielantigene des Schleimhautpemphigoids.....	8
1.3.4 Histopathologie	10
2 Fragestellung	11
3 Material und Methoden	12
3.1 Patienten und Datenerhebung	12
3.2 Direkte Immunfluoreszenz	12
3.3 Immunserologie	13
3.4 Histopathologie	13
3.5 Immunhistochemie.....	13
4 Ergebnisse	16
4.1 Sensitivität der direkten Immunfluoreszenz beim Schleimhautpemphigoid.....	16
4.1.1 Sensitivität der direkten Immunfluoreszenz bei Patienten, die einfach oder mehrfach biopsiert wurden.....	16
4.1.2 Übereinstimmung der Befunde der direkten Immunfluoreszenz bei Patienten, die gleichzeitig mehrfach biopsiert wurden	17
4.1.3 Befunde der direkten Immunfluoreszenz und immunsuppressive Therapie.....	18
4.1.4 Immunserologie	19
4.2 Sensitivität der Immunhistochemie beim Schleimhautpemphigoid	20

4.2.1	Histopathologie	20
4.2.2	Immunhistochemie für C3d und C4d	21
4.2.3	Immunhistochemie für IgG und IgA	24
5	Diskussion.....	25
5.1	Sensitivität der direkten Immunfluoreszenz beim Schleimhautpemphigoid.....	25
5.1.1	Sensitivität der direkten Immunfluoreszenz bei Patienten, die einfach oder mehrfach biopsiert wurden.....	25
5.1.2	Übereinstimmung der Befunde der direkten Immunfluoreszenz bei Patienten, die mehrfach biopsiert wurden.....	26
5.1.3	Befunde der direkten Immunfluoreszenz und immunsuppressive Therapie.....	28
5.1.4	Immunserologie	29
5.2	Sensitivität der Immunhistochemie beim Schleimhautpemphigoid	29
5.2.1	Immunhistochemie für C3d und C4d	30
5.2.2	Immunhistochemie für IgG und IgA	31
6	Zusammenfassung.....	33
7	Literaturverzeichnis	35
8	Anhang.....	43
9	Veröffentlichungen	50
10	Danksagung	51

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klinik des Schleimhautpemphigoids	4
Abbildung 2: Direkte Immunfluoreszenz einer Mundschleimhautbiopsie einer Patientin mit Schleimhautpemphigoid	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Autoantigene des Schleimhautpemphigoids innerhalb der mukokutanen Basalmembranzzone	8
Abbildung 4: Diagnostisches Flussdiagramm bei 78 Patienten mit Schleimhautpemphigoid	17
Abbildung 5: Übereinstimmung der Befunde der direkten Immunfluoreszenz bei Patienten, die gleichzeitig mehrfach biopsiert wurden	18
Abbildung 6: Immunserologische Befunde bei 78 Patienten mit Schleimhautpemphigoid	19
Abbildung 7: Immunhistochemischer Nachweis von Komplementablagerungen beim Schleimhautpemphigoid	22
Abbildung 8: Immunhistochemische Reaktivität bei einem Patienten mit einem Lichen ruber der Mundschleimhaut.....	23
Abbildung 9: Immunhistochemische Reaktivität gegen IgG und IgA bei einem Patienten mit Schleimhautpemphigoid.....	24

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Demographie, Klinik, Immunpathologie und Serologie von Patienten mit Schleimhautpemphigoid	43
Tabelle 2: Histopathologische Befunde in den Gewebeproben von Patienten mit Schleimhautpemphigoid, die immunhistochemisch untersucht wurden.....	47
Tabelle 3: Klinik, Immunpathologie, Serologie und Immunhistochemie von Patienten mit Schleimhautpemphigoid	48

Abkürzungsverzeichnis

BP.....	bullöses Pemphigoid
BP180.....	Bullöses-Pemphigoid-Antigen 180
BP180 4575.....	Bullöses-Pemphigoid-Antigen 180 4575
BP230.....	Bullöses-Pemphigoid-Antigen 230
C3(d).....	Komplementfaktor C3(d)
C4(d).....	Komplementfaktor C4(d)
C-Terminus.....	Carboxy-Terminus
DIF.....	Direkte Immunfluoreszenz
ELISA.....	enzyme-linked immunosorbent assay
FFPE.....	in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet
HLA.....	humanes Leukozytenantigen
IHC.....	Immunhistochemie
IIF.....	Indirekte Immunfluoreszenz
kDa.....	Kilodalton
LAD-1.....	lineare IgA-Dermatose-Antigen-1
Lam 332.....	Laminin 332
NaCl.....	Natrium-Chlorid
NC.....	nicht-kollagen
N-Terminus.....	Amino-Terminus
SHP.....	Schleimhautpemphigoid

1 Einleitung

1.1 Bullöse Autoimmundermatosen

Bullöse Autoimmundermatosen sind eine Gruppe organspezifischer Autoantikörper vermittelter Autoimmunerkrankungen, die klinisch durch Blasen und Erosionen der Haut und der betroffenen Schleimhäute gekennzeichnet sind. Die genaue Ursache für den Toleranzverlust mit nachfolgender Autoantikörperbildung ist nicht bekannt. Die Strukturproteine, gegen die die Autoimmunantwort bei diesen Erkrankungen gerichtet ist, sind wichtig für die Adhäsion von Epithelzellen zueinander innerhalb des Haut- und Schleimhautepithels und sie sind verantwortlich für die Adhäsion des gesamten Epithels zur darunterliegenden Basalmembran. Es lassen sich vier Hauptgruppen der bullösen Autoimmundermatosen unterscheiden: Pemphiguserkrankungen, Pemphigoiderkrankungen, die Epidermolysis bullosa aquisata und die Dermatitis herpetiformis Duhring.

Pemphiguserkrankungen sind durch eine Autoimmunantwort hauptsächlich gegen die desmosomalen Strukturproteine Desmoglein 1 und 3 gekennzeichnet. Die Autoantikörperbindung führt zum Verlust der Zell-Zell-Kontakte innerhalb des Epithels mit daraus resultierender intraepithelialer Blasenbildung.

Die anderen genannten Hauptgruppen zeichnen sich im Gegensatz zum Pemphigus durch eine subepidermale Blasenbildung aus. Neben dem in dieser Arbeit thematisierten Schleimhautpemphigoid (SHP) sind als weitere wichtige Pemphigoiderkrankungen das bullöse Pemphigoid (BP), das Pemphigoid gestationis, die lineare IgA-Dermatose, das anti-p200-Pemphigoid und der Lichen ruber pemphigoides zu nennen. Bei Pemphigoiderkrankungen können verschiedene Bestandteile des dermoepidermalen Verankerungskomplexes als Antigene fungieren. Beim SHP sind vor allem das 180 kDa schwere bullöse-Pemphigoid-Antigen 180 (BP180) und Laminin 332 (Lam 332) sowie selten $\alpha_6\beta_4$ -Integrin, das 230 kDa schwere bullöse-Pemphigoid-Antigen 230 (BP230) und Typ-VII-Kollagen; beim bullösen Pemphigoid (BP): BP180 und BP230; beim Pemphigoid gestationis: BP180, BP230; bei der linearen IgA-Dermatose: BP180,

v. a. das lineare IgA-Dermatose-Antigen-1 (LAD-1); beim anti-p200-Pemphigoid: das p200-Antigen und beim Lichen ruber pemphigoides: BP180 und BP230 [7].

Bei der Epidermolysis bullosa acquisita bilden sich Autoantikörper gegen den Hauptbestandteil von Verankerungsfibrillen, das Typ-VII-Kollagen. Bei der mit einer Zöliakie assoziierten Dermatitis herpetiformis Duhring richten sich die Autoantikörper gegen die epidermale Transglutaminase.

1.2 Schleimhautpemphigoid

Erstmals beschrieben wurde das SHP durch Lever bereits 1951, aber erst im Jahr 2002 wurde in einer internationalen Konsensuskonferenz das SHP näher definiert als eine blasenbildende Autoimmundermatose, die sich vorwiegend an den Schleimhäuten manifestiert und histologisch zu einer subepithelialen Spaltbildung führt [9, 30]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 60-65 Jahren, Frauen sind mit einem Verhältnis von 2:1 häufiger betroffen als Männer [1, 53]. In Deutschland liegt die Inzidenz geschätzt bei 1,3-2,0 Neuerkrankungen pro 1 Million Einwohner pro Jahr und ist somit nach dem BP die zweithäufigste Pemphigoiderkrankung [4, 5]. Zu bestimmten humanen Leukozytenantigenen (HLA) konnte eine Assoziation gezeigt werden [8, 14, 16, 36, 37, 51, 55]. Abhängig von dem Manifestationsort der Erkrankung konsultieren die Patienten häufig verschiedene Fachrichtungen, wie Augenärzte, Hals-Nasen-Ohren-Ärzte, Zahnärzte oder Dermatologen. Dies kann zu einer Verzögerung der Diagnosestellung eines SHP führen. Dazu untersuchte eine britische Studie 50 Patienten mit okulärem SHP und ermittelte einen Zeitraum von 2,5 Jahren, selten bis zu 10 Jahren von Erstkonsultation eines Arztes bis zur Diagnosestellung [41].

1.2.1 Klinik

Das SHP ist eine klinisch heterogene chronisch-progressive Erkrankung. Der Krankheitsverlauf ist in der Regel in 2 Phasen einzuteilen: Der Beginn ist zunächst langsam progredient und auf eine Lokalisation beschränkt, wobei die Erkrankung später in einen aggressiven Verlauf mit oft generalisierender Ausprägung übergeht [1]. Somit ist das Ausmaß der Erkrankungsmanifestation sehr variabel und kann von geringen Einschränkungen der Lebensqualität bis hin zu einer

Lebensbedrohung führen. Charakteristischerweise heilen die SHP-Läsionen in der Regel unter Vernarbung ab. Mundschleimhautläsionen bilden eine Ausnahme, weswegen die alte Bezeichnung der Erkrankung „vernarbendes Pemphigoid“ nicht mehr verwendet werden sollte [9]. In 85% der Fälle ist die Mundschleimhaut betroffen. Die typische Primärmanifestation ist eine erosive Gingivitis. Selten sind Blasen sichtbar, die im Verlauf schnell rupturieren und zu schlecht heilenden Erosionen/Ulzerationen führen (**Abbildung 1, A**). Die Schleimhäute von Gingiva und Gaumen sind dabei häufiger betroffen als die der Lippen, Zunge und der Wangen [1, 9]. Bei bis zu 20% der Patienten mit SHP bleibt die Klinik auf die Konjunktiven beschränkt. In diesem Fall ist der Terminus „okuläres Schleimhautpemphigoid“ zu benutzen [9, 53]. Eine jahrelang bestehende erosive Konjunktivitis, eine Verkürzung der Fornices conjunctivae, eine Verwachsung der Bindehäute von Lid und Augapfel (Symblepharon) oder der Augenlider (Ankyloblepharon), ein ins Auge Neigen der Wimpern (Entropium), ein Reiben der Wimpern auf der Cornea (Trichiasis), Neovaskularisation und Vernarbungen bis zur Erblindung können das klinische Bild eines okulären SHP widerspiegeln (**Abbildung 1, B**). Eine Mitbeteiligung der Augen ist bei 65% der Patienten zu finden [1, 9]. Interessanterweise beginnt der okuläre Befall meist unilateral, wobei sich der Befund nach etwa 2 Jahren zumeist zu beiden Seiten ausweitet [50]. Patienten mit diagnostiziertem SHP ohne initialen okulären Befund entwickeln mit einem kumulativen Risiko von 22% eine Mitbeteiligung der Augen in den ersten 5 Jahren nach Erstmanifestation, eine weitere Schleimhautbeteiligung bei Patienten mit okulärem SHP ist mit circa 80% hoch wahrscheinlich [53]. Zwanzig Prozent der Patienten zeigen eine anogenitale Krankheitsbeteiligung mit Bildung von Blasen, Erosionen und Vernarbungen am Anus sowie auf der Glans penis und Vorhaut beim Mann oder den Labia majora und minora der Frau [1, 9]. Fortschreitende Vernarbungen können zu Stenosierungen der Vagina oder der Urethra führen [1]. Nasopharyngeale Manifestationen treten bei 20-40% der Patienten auf und können durch Dysphagien bedingt durch Erosionen vor allem an der hinteren und lateralen Pharynxwand auffallen. Nasale Läsionen finden sich gehäuft mit Krusten bedeckt am Nasenseptum [1]. Bei 20% der Patienten mit SHP liegt eine Beteiligung des Pharynx vor [1, 9]. Bei einem Befall des Larynx (in 5-10% der Patienten) findet der Untersucher Erosionen an der Epiglottis oder an den aryepiglottischen Falten. Zudem kann es als Komplikation zu Ödembildung und

Vernarbung mit einhergehender Stenose der oberen Luftwege kommen. Dies kann zu einer lebensbedrohlichen Atemnot führen [1]. Der Ösophagus ist bei 5-15% der Patienten befallen und kann im oberen Drittel Erosionen aufweisen, die ebenso im Verlauf vernarben, zu Schluckbeschwerden und zu Passagehindernissen der Nahrung führen können [1]. Eine Hautbeteiligung kann im Rahmen eines SHP in 25-35% der Patienten auftreten, steht aber im Gegensatz zum BP nicht im Vordergrund [1, 9]. Prädilektionsstellen sind der Kopf und der obere Rumpf. Eine Vernarbung ist ähnlich wie bei der Mundschleimhaut nicht regelhaft [1, 9].

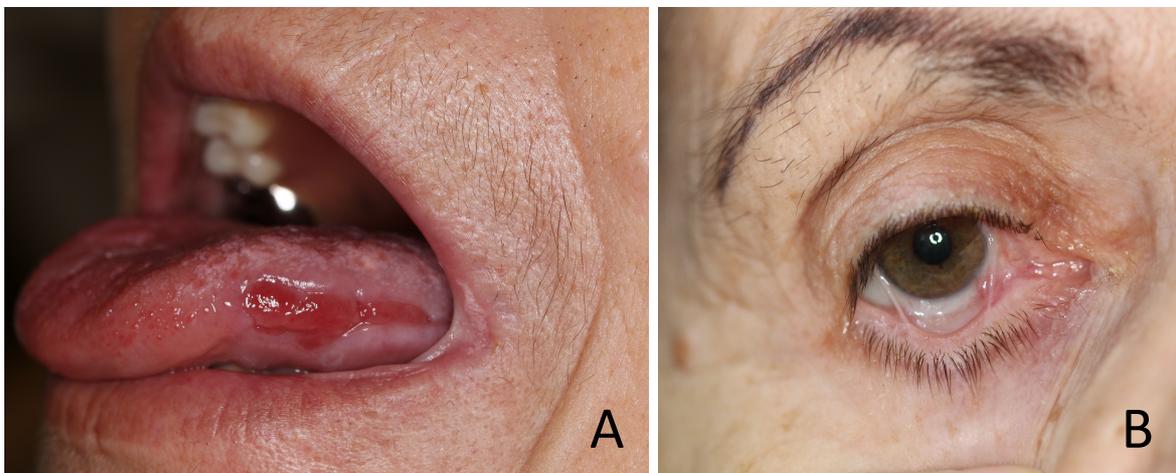


Abbildung 1: Klinik des Schleimhautpemphigoids

(A) Erosion der linken Zungenkante und (B) Narbenstränge zwischen Lid und Sklera (Symblepharon) des rechten Auges bei Patientin 66 (Tabelle 1).

1.3 Diagnostik des Schleimhautpemphigoids

Die Diagnosekriterien für das SHP wurden im Rahmen der internationalen Konsensuskonferenz festgelegt [9]. Die passende Klinik sowie lineare Ablagerungen von IgG, IgA und/ oder Komplementfaktor 3 (C3) an der mukokutanen Basalmembran in der direkten Immunfluoreszenz (DIF) gelten als entscheidend für die Diagnosestellung eines SHP [9]. Zusätzlich können auch die Befunde der Immunserologie und Histopathologie herangezogen werden.

1.3.1 Direkte Immunfluoreszenz

Die DIF zum Nachweis linearer Ablagerungen von IgG, IgA und/ oder C3 entlang der mukokutanen Basalmembran ist die Methode mit der höchsten Sensitivität und daher Goldstandard in der Diagnostik des SHP [9]. Ihre Sensitivität wurde durch viele Studien mit 70-80% beschrieben [3, 22, 44, 45, 48]. Allerdings ist bei all diesen Studien in DIF-negativen Fällen die Diagnose anhand einer passenden Klinik und/ oder Histopathologie gestellt worden. Dies entspricht nicht den durch die Konsensuskonferenz im Jahre 2002 festgelegten Diagnosekriterien [9].

Die DIF detektiert gewebsgebundene Moleküle wie Immunglobuline oder Komplementfaktoren innerhalb einer Biopsie (**Abbildung 2**). Sie wird an gefrorenem, nicht Formalin-fixiertem Gewebe durchgeführt. An den aufgearbeiteten Kryoschnitten können durch fluoreszierende Zweitantikörper die Lokalisation der Ablagerungen sowie die Art und Intensität von abgelagerten Molekülen (z.B. Antikörperklasse, Komplement) unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden [35]. Charakteristisch für das SHP zeigen sich, wie in **Abbildung 2** dargestellt, lineare Ablagerungen von IgG, IgA und/ oder C3 entlang der mukokutanen Basalmembranzone [35]. Die bereits erwähnte Konsensuskonferenz empfiehlt, dass die Biopsie streng periläsional, also aus makroskopisch normal erscheinender Haut oder Schleimhaut, zu entnehmen ist [9].

Sano et al. untersuchten an blasenbildenden Autoimmundermatosen mit oraler Manifestation den Einfluss der Distanz von dem Ort der Probenentnahme zur Läsion auf die Sensitivität der DIF. Dabei definierten sie periläsional als 1 cm von der Läsion entfernt und fanden keinen signifikanten Unterschied in der Nachweiswahrscheinlichkeit der DIF zu einer über 1 cm entfernten Probe [48]. Wird die Gewebeprobe allerdings läsional entnommen, so kann dies ein falsch-negatives Ergebnis der DIF zur Folge haben, da Immunablagerungen teilweise oder komplett durch den Entzündungsprozess abgebaut werden können [35]. Die anatomische Lokalisation für die Entnahme einer Biopsie innerhalb der Mundschleimhaut ist von vielen Studien kontrovers diskutiert worden [12, 18, 22, 48]. Eine generelle Empfehlung konnte aufgrund fehlender Signifikanz bisher nicht ausgesprochen werden. Für die Probengewinnung ist eine Stanze einem Skalpell zu bevorzugen [48]. Bei singulärem Schleimhautbefall sollte die Probe an

betroffener Lokalisation, bei multiplen Manifestationen an einer betroffenen, aber nicht-okulären Schleimhaut entnommen werden. Falls eine Haut- und Schleimhautbeteiligung vorliegt, empfiehlt es sich, initial die Haut zu biopsieren [9].

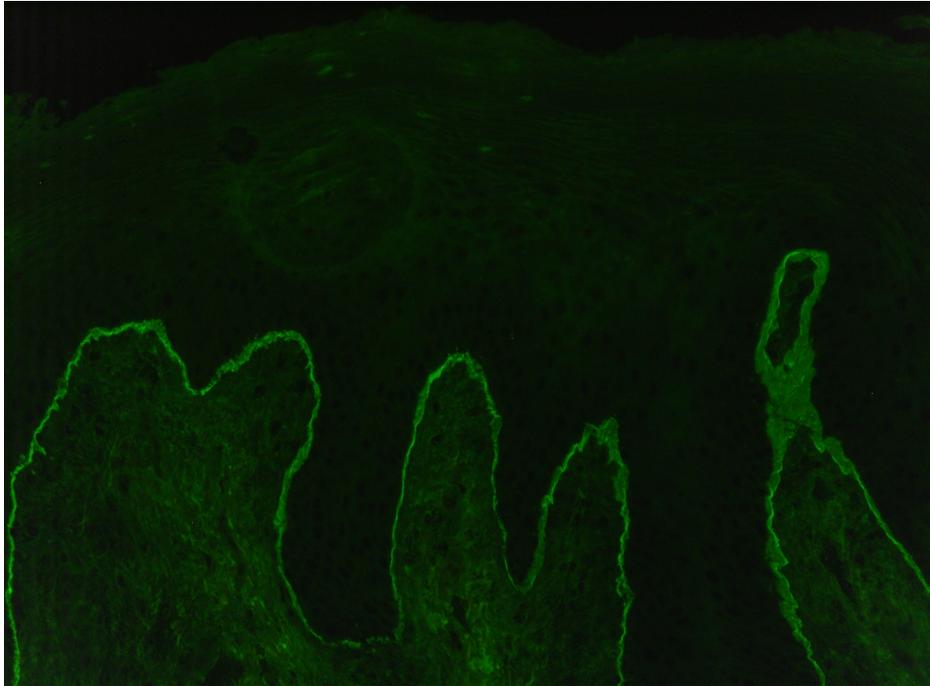


Abbildung 2: Direkte Immunfluoreszenz einer Mundschleimhautbiopsie einer Patientin mit Schleimhautpemphigoid

Lineare Ablagerungen von IgG entlang der mukokutanen Basalmembran einer Mundschleimhautbiopsie von Patientin 66 (Tabelle 1).

Originalvergrößerung 200x.

1.3.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) kann, wie die DIF, zum Nachweis von gewebsgebundenen Antikörpern oder Komplementfaktoren eingesetzt werden. Diese Technik nutzt enzymatische Reaktionen (Peroxidase oder alkalische Phosphatase) zur Erkennung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Anders als die DIF wird die IHC regelhaft an in Formalin fixiertem, in Paraffin eingebettetem (FFPE) läsional entnommenem Gewebe durchgeführt und gehört zur alltäglichen Routine in Pathologielaboren. Der Nutzen der IHC bei bullösen Autoimmundermatosen wie dem BP, dem Pemphigoid gestationis und dem Pemphigus wurde bereits in einigen Studien untersucht [11, 15, 20, 25, 32, 39, 40, 54, 56]. Dabei variierte die Sensitivität der IHC bei Patienten mit BP von 37-100%

erheblich [11, 20, 25, 32, 39, 54]. Die IHC war somit in den meisten Untersuchungen weniger sensitiv als die DIF, die Goldstandard in der Diagnostik bullöser Autoimmundermatosen bleibt. Beim SHP steht allerdings ähnlich wie bei den anderen Autoimmundermatosen nicht immer Kryomaterial für eine DIF zur Verfügung, da diese Differentialdiagnose bei chronisch ulzerierenden Schleimhautentzündungen nicht immer vermutet wird oder der behandelnde Arzt mit der Diagnostik dieser seltenen Erkrankung nicht vertraut ist. In diesem Fall wird lediglich eine läsionale Biopsie entnommen und in Formalin fixiert zum Dermatopathologen eingeschickt. Für eine solche Situation wäre der Einsatz von IHC am FFPE-Gewebe von Interesse. Bisher wurde die Sensitivität der IHC beim SHP nur an 7 Patienten und nur gegen den Faktor C3d untersucht und im Rahmen eines Symposiums vorgestellt [46]. Lediglich bei 2 von 7 Patienten konnten Ablagerungen von C3d an der mukokutanen Basalmembran nachgewiesen werden. Daten zur Sensitivität der IHC an einem größeren Kollektiv von Patienten mit SHP sowie Untersuchungen von Ablagerungen anderer Immunreaktanten existieren bisher keine.

1.3.3 Immunerologie

Im Gegensatz zu der DIF und IHC dient die Immunerologie bei blasenbildenden Autoimmundermatosen dem Nachweis von im Blut zirkulierenden Autoantikörpern (IgG und IgA). Es werden antigenunspezifische Verfahren von antigenspezifischen Verfahren unterschieden. Die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) ist ein antigenunspezifisches Verfahren. Als sensitivstes Substrat dient die mit NaCl-separierte normale humane Haut, die mit Patientenserum beschichtet wird. Mithilfe von fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern können Autoantikörper sichtbar gemacht werden. Dabei entstehen abhängig von den erkannten Strukturproteinen unterschiedliche Bindungsmuster in der artifiziellen Blase (Blasendach: BP180, BP230, $\alpha_6\beta_4$ -Integrin; Blasenboden: Lam 332, Typ VII-Kollagen) [19]. Die Antikörpertiter sind im Falle eines SHP niedrig (1:10-1:40). Die Sensitivität der IIF liegt bei circa 50-80% [50]. Parallel zu der IIF kann mithilfe von antigenspezifischen Verfahren wie dem ELISA und Immunoblot ein genaues Zielantigen in der dermoepidermalen Junktionszone charakterisiert werden. Im ELISA können IgG-Antikörper gegen die immundominante nicht-kollagene (NC)

Domäne NC16A des BP180 und gegen BP230 detektiert werden. Im Immunoblot werden IgG- und/ oder IgA- Antikörper gegen spezielle Zielbereiche von BP180 (LAD-1, BP180 4575), Lam 332 und in seltenen Fällen gegen das Typ VII-Kollagen, $\alpha_6\beta_4$ -Integrin und gegen das p200-Antigen nachgewiesen.

1.3.3.1 Zielantigene des Schleimhautpemphigoids

Die wichtigsten Zielantigene des SHP sind in **Abbildung 3** vereinfacht dargestellt.

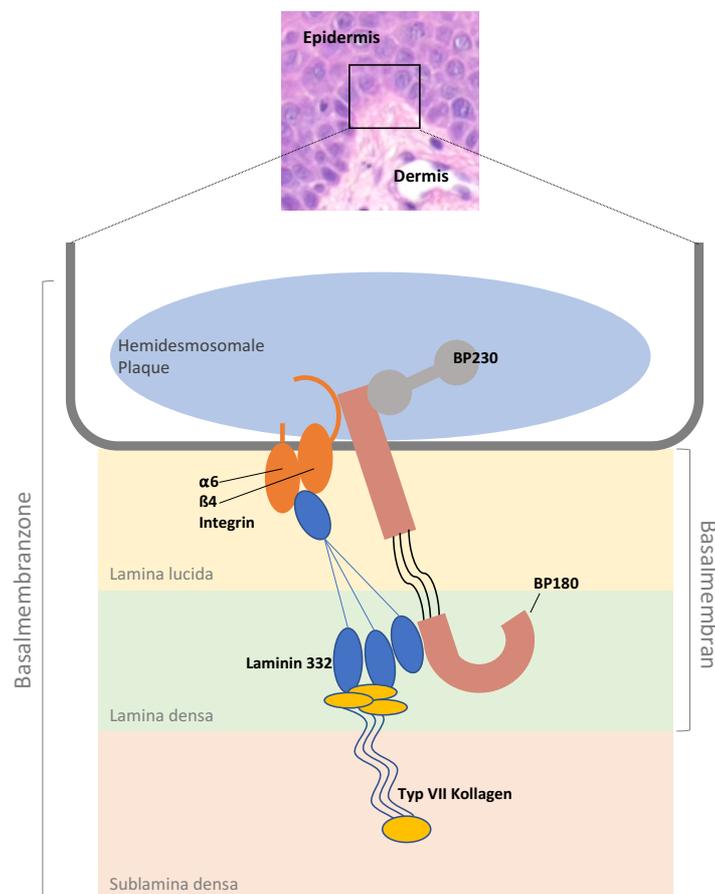


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Autoantigene des Schleimhautpemphigoids innerhalb der mukokutanen Basalmembranzzone

Die mukokutane Basalmembranzzone enthält eine Kette von Adhäsionsproteinen, welche ein fein strukturiertes Gerüst bilden [7, 31]. Die transmembranösen Hemidesmosomen und die im Bereich der Lamina lucida sowie der oberen Lamina densa liegenden Verankerungsfilamente sorgen für die Adhäsion der Keratinozyten an die Basalmembran. Die Verankerungsfibrillen bilden mit ihren vielen Bindungsmöglichkeiten molekulare Netze aus und sorgen für die Befestigung der mukokutanen Basalmembran an die papilläre Dermis.

Das bullöse-Pemphigoid-Antigen 230 (BP230) als intrazellulärer Bestandteil der hemidesmosomalen Plaque steht in Verbindung mit dem ebenso zur Plaque zählenden transmembranösen bullösen-Pemphigoid-Antigen 180 (BP180), welches bis in die obere Lamina densa reicht und dem $\alpha_6\beta_4$ -Integrin, das bis in die Lamina

lucida reicht. Das Laminin 332 ist ein Hauptbestandteil der Verankerungsfilamente und das Typ-VII-Kollagen ist ein Hauptbestandteil der Verankerungsfibrillen. (Modifizierte Abbildung in Anlehnung an [50].)

Bei 75% der Patienten mit SHP richten sich Autoantikörper gegen das BP180, welches auch als Typ XVII-Kollagen bezeichnet wird [37]. Bei den übrigen 25% lassen sich Antikörper gegen BP230, Lam 332 (Synonym: Laminin 5, Epiligrin), beide Untereinheiten von $\alpha_6\beta_4$ -Integrin oder Typ VII-Kollagen nachweisen [50]. BP180 ist ein transmembranöses Protein und gehört zur hemidesmosomalen Plaque der basalen Keratinozyten (**Abbildung 3**). Es besteht aus einem intrazellulären Abschnitt mit dem N-Terminus und einer Ektodomäne mit dem C-Terminus. Autoantikörper beim SHP greifen bevorzugt extrazellulär gelegene Domänen sowie den C-terminalen Abschnitt an [29]. Dabei ist die unmittelbar unterhalb der zytoplasmatischen Membran der basalen Keratinozyten gelegene nicht-kollagene Domäne 16A (NC16A) häufig betroffen [49]. Seltener kann eine Reaktivität gegen das C-terminale Fragment 4575 oder gegen intrazelluläre Epitope nachgewiesen werden [49]. Neben der beständigen Form der Ektodomäne von BP180 existiert zudem ein proteolytisches Spaltprodukt, welches als lineare IgA-Dermatose-Antigen-1 (LAD-1) bezeichnet wird [2, 23, 33, 49]. LAD-1 ist 120 kDa schwer und weist durch seine Abspaltung zusätzlich zu den Epitopen der Ektodomäne von BP180 N-Terminal gelegene Neopepitope auf, die beim SHP häufig autoimmunologisch erkannt werden [33, 38, 49, 60]. Lam 332 ist ein Heterotrimer, bestehend aus den namengebenden α_3 , β_3 und γ_2 -Kette. Innerhalb des Lam 332-Moleküls stellt die α_3 -Untereinheit das bevorzugte Ziel der Autoantikörper bei Patienten mit SHP dar [24]. Bei den Antigenen BP180 und Lam 332 konnte die pathogenetische Bedeutung an in vitro- und in vivo-Modellen verdeutlicht werden [10, 26, 28, 43]. Für das $\alpha_6\beta_4$ -Integrin liegt bisher nur ein in vitro-Nachweis der pathogenetischen Relevanz vor [10]. Bei Auto-Reaktivität gegen BP180 werden sowohl IgG- als auch IgA-Antikörper gebildet, wohingegen bevorzugt IgG gegen BP230, β_4 -Integrin und Lam 332 nachgewiesen werden konnte [37, 49]. Gehäufte Koreaktivitäten zwischen BP180 und BP230 sowie zwischen BP180 und β_4 -Integrin sind beschrieben [37]. Je nach Zielantigen bestehen Assoziationen zu internistischen Erkrankungen oder einem bevorzugten Befall bestimmter Schleimhautareale. Patienten mit Antikörpern gegen das β_4 -Integrin haben häufiger einen okulären Befall, wohingegen Patienten mit

Reaktivität gegen das α_6 -Integrin zumeist Mundschleimhautläsionen aufweisen [37, 42]. Anti-Lam 332-positive Patienten haben zu etwa 30% eine Assoziation zu malignen soliden Tumoren, sodass es sich hier um eine fakultative Paraneoplasie handelt [17, 47]. Am häufigsten konnten Karzinome des Magens, der Lunge und seltener des Kolons und des Endometriums nachgewiesen werden.

1.3.4 Histopathologie

Als Nebenkriterium in der Diagnostik des SHP kann eine Histopathologie von einem läsional entnommenen FFPE-Gewebe lichtmikroskopisch untersucht werden. Das SHP ist gekennzeichnet durch eine subepidermale Blasenbildung mit oder ohne signifikantem Leukozyteninfiltrat. Häufig findet sich allerdings nur ein unspezifischer Befund in Form eines Ulkus mit einer gemischtzelligen Entzündung [7].

2 Fragestellung

Das Schleimhautpemphigoid ist eine schwere, potentiell lebensbedrohliche, fortschreitende, blasenbildende Autoimmundermatose, die durch eine chronisch vernarbende Entzündung der betroffenen Schleimhäute zu einer massiven Verminderung der Lebensqualität führt. Eine möglichst frühzeitige Diagnosestellung ist von großer praktischer Relevanz, da diese die Voraussetzung für eine Einleitung einer immunsuppressiven Therapie darstellt. Die charakteristische Klinik in Kombination mit einer positiven direkten Immunfluoreszenz ist derzeit der Goldstandard in der Diagnostik eines Schleimhautpemphigoids.

Im klinischen Alltag fällt immer wieder auf, dass die direkte Immunfluoreszenz nicht selten falsch-negativ ausfallen kann und sich dadurch die Diagnosestellung deutlich verzögert. Zusätzlich wird zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme bei einem Patienten mit einer chronisch ulzerierenden Schleimhautentzündung nicht immer an die Diagnose eines Schleimhautpemphigoids gedacht und somit nicht das notwendige Gefriermaterial einer periläsionalen Biopsie entnommen, sondern lediglich eine läsionale Biopsie der suspekten Schleimhaut oder Haut in Formalin eingelegt und dem Dermatopathologen zur Begutachtung eingereicht.

Wir wollten mit dieser Arbeit untersuchen, ob und inwieweit durch multiple und wiederholte Biopsien die Sensitivität der direkten Immunfluoreszenz zur Diagnostik des Schleimhautpemphigoids gesteigert werden kann und ob und inwieweit eine Immunhistochemie an einer in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeprobe eine Alternative zur direkten Immunfluoreszenz am Kryomaterial darstellen kann.

3 Material und Methoden

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck überprüft und genehmigt (Aktenzeichen: 12-178, 07.10.2015).

3.1 Patienten und Datenerhebung

In unsere Studie eingeschlossen wurden insgesamt 78 Patienten mit der Diagnose eines SHP, die sich in dem 10-jährigen Zeitraum vom 01.01.2006 bis zum 01.01.2016 an der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck vorgestellt haben. Retrospektiv identifiziert wurden diese Patienten durch die Recherche in der klinikeigenen Datenbank des Autoimmunlabors unter dem Stichwort „Schleimhautpemphigoid“. Einschlusskriterien waren (i) eine charakteristische Klinik, (ii) der Nachweis von linearen Ablagerungen von IgG, IgA oder C3 entlang der Basalmembran in der DIF und/ oder der Nachweis von zirkulierenden IgG- oder IgA-Antikörpern gegen BP180, Lam 332 oder Typ VII-Kollagen im Immunoblot oder ELISA. Alle Patienten hatten zum Zeitpunkt der initialen DIF eine aktive, klinisch manifeste Erkrankung. Die Informationen zum klinischen Bild der Patienten wurden aus den ambulanten und stationären Krankengeschichten entnommen. Zudem wurden entsprechende autoimmunologische und histopathologische Befunde aus den Krankenakten erhoben. Alle erfassten Daten wurden pseudonymisiert. Von unseren 78 eingeschlossenen Patienten lag für 33 Patienten ein geeignetes FFPE-Gewebe vor, an dem immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt wurden. Die Sensitivitäten der verschiedenen Verfahren wurden nach der Standardformel bestimmt: Richtig als krank Erkrankte/ (Richtig als krank Erkrankte + Falsch als gesund Erkrankte).

3.2 Direkte Immunfluoreszenz

Die periläsional entnommenen Haut- und Schleimhautbiopsien wurden bei -20°C schockgefroren. Von dem Gefriermaterial wurden 6 µm dicke Kryoschnitte angefertigt. Diese wurden mit Fluoresceinisothiocyanat-markierten Antikörpern

gegen humanes C3 (BioLogo, Kronshagen, Deutschland), IgG und IgA (beide Bio-Rad, Marne-la-Coquette, Frankreich) wie beschrieben inkubiert [57].

Biopsien mit mikroskopisch nachweisbarer subepithelialer Spaltbildung wurden aus der Studie ausgeschlossen.

3.3 Immunserologie

Als Substrat für die indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von IgG- und IgA-Antikörpern in den Patientenseren wurde durch 1 M NaCl-Lösung separierte normale humane Spalthaut verwendet. Rekombinantes BP180 NC16A und rekombinantes BP230 C3 wurden zur Detektion von IgG-Autoantikörpern gegen diese Antigene im ELISA genutzt. Für den Immunoblot wurde rekombinantes BP180 4575 (IgG, IgA), ein konzentriertes Medium von kultivierten HaCat-Keratinocyten zum Nachweis einer IgG-/ IgA- Reaktivität gegen LAD-1, extrazelluläre Matrix von HaCat-Zellen zum Nachweis einer IgG-/ IgA- Reaktivität gegen Lam 332, sowie zelluläre Extrakte von kultivierten HaCaT-Keratinocyten zum Nachweis einer IgG-/ IgA-Reaktivität gegen BP180 genutzt. Der Immunoblot mit humanen dermalen Extrakten diente dem Nachweis einer IgG-Reaktivität gegen Typ VII-Kollagen und p200-Antigen. Die Untersuchungen wurden im Rahmen der Routinediagnostik im Autoimmunlabor der Hautklinik nach publizierten Protokollen durchgeführt [6, 27, 49, 52, 58, 59].

3.4 Histopathologie

Läsionale Biopsien, die für die Routinehistopathologie entnommen wurden, wurden in einer Formalinlösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Von diesen Paraffinblöcken wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin (HE) nach Standardprotokoll gefärbt.

3.5 Immunhistochemie

Die Untersuchung erfolgte an FFPE-Gewebe. Es wurden ausschließlich Biopsien eingeschlossen, die eine intakte Basalmembranzzone aufwiesen. Zum Ausschluss

falsch-negativer Ergebnisse befand sich auf jedem Objektträger neben der zu untersuchenden Probe des Patienten mit SHP eine Positivkontrolle.

Für den Nachweis von Ablagerungen von C3d und C4d dienten Hautbiopsien von 6 Patienten mit gesichertem BP als Positivkontrolle. Zur Detektion von Ablagerungen von Immunglobulinen wurden Hautbiopsien von 3 Patienten mit diskoidem Lupus erythematodes (IgG, IgA), von 2 Patienten mit linearer IgA-Dermatose (IgA) und von 2 Patienten mit Dermatitis herpetiformis (IgA) als Positivkontrollen verwendet. Außerdem nutzten wir zum Kontrollnachweis von Immunglobulinen Tonsillengewebe nach Tonsillektomie (IgG, IgA).

Als Negativkontrollen fungierten Schleimhautbiopsien von 6 Patienten mit oralem Lichen ruber, sowie Hautproben von 5 Patienten mit kutanem Lichen ruber planus, von 4 Patienten mit Psoriasis und von 4 Patienten mit atopischer Dermatitis. Auch auf diesen Objektträgern befanden sich neben jeder Negativkontrolle eine Positivkontrolle.

Die Diagnosesicherung bei Positivkontrollen erfolgte anhand der passenden Histopathologie und folgender Befunde der DIF:

BP: lineare Ablagerungen von IgG und C3 entlang der Basalmembran; lineare IgA-Dermatose: lineare Ablagerungen von IgA entlang der Basalmembran; Dermatitis herpetiformis: granuläre Ablagerungen von IgA in den dermalen Papillen; Lupus erythematodes: bandartige Ablagerungen von IgA, IgG, IgM und C3 entlang der Basalmembran.

Die Diagnosen der Negativkontrollen wurden mittels der jeweils typischen Histopathologie gestellt.

Die 4 µm dicken Schnitte wurden mit dem Leica Bond Max Autostainer (Leica, Wetzlar) bearbeitet. Vorbehandelt wurden die Proben mit der Bond Epitope Retrieval Solution 1 (Citratpuffer; AR9961). Danach wurden sie jeweils mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen humanes C3d (1:8000, DAKO, Glostrup, Dänemark), polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen humanes C4d (1:100, Zytomed Systems, Berlin), monoklonalen Maus-Antikörpern gegen humanes IgG (Verdünnungen 1:10-1:200, Klon RWP49, Leica) und monoklonalen Maus-Antikörpern gegen humanes IgA (Verdünnungen 1:5 – 1:30, Klon N1CLA, Leica) inkubiert.

Alle Schnitte wurden unabhängig von 3 Wissenschaftlern untersucht (Priv.-Doz. Dr. med. Iakov Shimanovich, Priv.-Doz. Dr. med. Christian Rose, Julia M. Nitz).

Die Beurteilung erfolgte semiquantitativ: positiv (+), stark positiv (++) oder negativ (-).

Die Schnitte und Färbungen, sowohl für die Immunhistochemie, als auch für die Histopathologie wurden von den Mitarbeitern des dermatohistologischen Labors unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. C. Rose in Lübeck angefertigt.

4 Ergebnisse

4.1 Sensitivität der direkten Immunfluoreszenz beim Schleimhautpemphigoid

Zur Ermittlung der Sensitivität der DIF in der Diagnostik eines SHP wurden insgesamt 136 periläsionale Biopsien von 78 Patienten mit SHP untersucht (**Tabelle 1**). Darunter waren 34 Männer und 44 Frauen im Alter von 23 - 93 Jahren (Median: 65 Jahre).

4.1.1 Sensitivität der direkten Immunfluoreszenz bei Patienten, die einfach oder mehrfach biopsiert wurden

In 52 von 78 Fällen wurde initial eine einzelne Biopsie für eine DIF untersucht. Bei den restlichen 26 von 78 Patienten wurden im Rahmen der ersten Untersuchung mehrere Biopsien simultan entnommen (**Abbildung 4**). Von den 52 Patienten mit anfangs nur einer DIF war das Ergebnis in 36 Fällen positiv (Sensitivität: 69%). Bei den verbliebenen 16 Patienten wurde die Biopsieentnahme zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt. Bei 13 dieser Patienten war der DIF-Befund dann positiv, sodass die Diagnose eines SHP gesichert werden konnte. Bei 3 von 52 Patienten blieb die DIF auch bei Wiederholung negativ, hier wurde aufgrund eines positiven Antikörpernachweises gegen BP180 und passender Klinik die Diagnose als gesichert betrachtet (**Abbildung 4**).

Im Rahmen der ersten diagnostischen Abklärung wurden bei 26 Patienten simultan mehrere Biopsien entnommen. In 22 von 26 Fällen war mindestens ein DIF-Befund in mindestens einer Biopsie positiv, dies ergab eine Sensitivität der DIF von 85%. Drei Patienten haben im Rahmen späterer, wiederholter Untersuchungen positive DIF-Befunde gezeigt. Der DIF-Befund eines Patienten blieb auch bei Wiederholung negativ. In diesem Fall wurde die Diagnose anhand des serologischen Nachweises von Antikörpern gegen BP180 und passender Klinik gesichert (**Abbildung 4**).

Zusammenfassend konnte bei 74 von 78 Patienten (95%) ein positiver DIF-Befund nachgewiesen werden, in 4 Fällen wurde die Diagnose anhand von zirkulierenden Antikörpern im Serum gestellt (**Abbildung 4**).

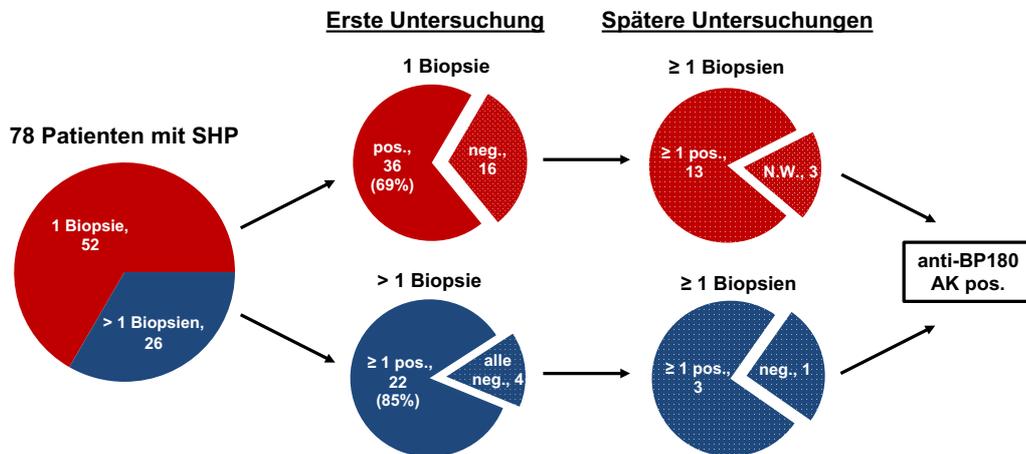


Abbildung 4: Diagnostisches Flussdiagramm bei 78 Patienten mit Schleimhautpemphigoid

Von den 52 Patienten, die initial nur eine Biopsie für eine direkte Immunfluoreszenz (DIF) erhielten, war diese in 36 Fällen (Sensitivität: 69%) positiv (pos.). Bei 16 von diesen 52 Patienten (31%) war die erste einzelne DIF negativ (neg.), während spätere DIF-Untersuchung(en) positive Befunde erbrachten. Bei 22 von 26 Patienten (85%), die im Rahmen einer initialen diagnostischen Abklärung zwei oder mehr Biopsien für die DIF erhielten, konnte in einer Biopsie ein positiver Befund erhoben werden. Zusammenfassend konnte das Schleimhautpemphigoid bei 74 Patienten mittels DIF gesichert werden. In 4 übrigen Fällen blieb die DIF negativ oder wurde nicht wiederholt (N.W.). Die Diagnose wurde alleine durch den Nachweis zirkulierender Autoantikörper (AK) gegen das bullöse-Pemphigoid-Antigen 180 (BP180) bestätigt.

4.1.2 Übereinstimmung der Befunde der direkten Immunfluoreszenz bei Patienten, die gleichzeitig mehrfach biopsiert wurden

Bei 32 von 78 Patienten wurden im Rahmen der ersten oder späteren Untersuchungen simultan mehrere Biopsien zur Durchführung einer DIF entnommen (**Abbildung 5**). Bei 21 von 32 Patienten zeigte die DIF ein gleich (konkordant) positives oder negatives Ergebnis. Die Biopsien von 17 Patienten waren konkordant positiv und von 4 Patienten konkordant negativ. In 11 Fällen waren die zu einem Zeitpunkt entnommenen Biopsien in ihrem Befund ungleich (diskordant), also positiv und negativ (**Abbildung 5**).

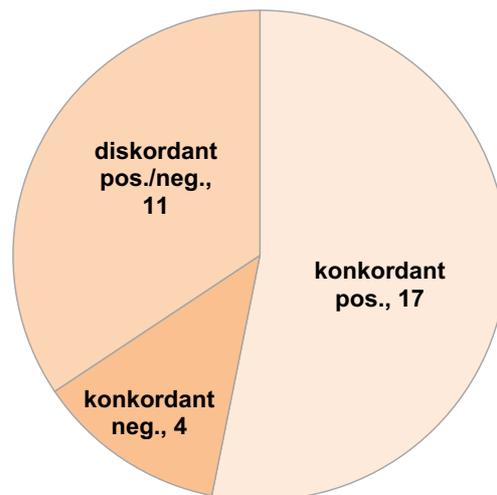


Abbildung 5: Übereinstimmung der Befunde der direkten Immunfluoreszenz bei Patienten, die gleichzeitig mehrfach biopsiert wurden

Bei 17 Patienten mit gleichzeitig gewonnenen multiplen Biopsien waren die Befunde der direkten Immunfluoreszenz (DIF) konkordant positiv (pos.), während sich bei 11 Patienten in verschiedenen Biopsien diskordante positive und negative (neg.) Ergebnisse zeigten. Bei 4 Patienten waren die Befunde der DIF konkordant negativ.

4.1.3 Befunde der direkten Immunfluoreszenz und immunsuppressive Therapie

Zu den Zeitpunkten der ersten oder später durchgeführten Biopsien bestand bei allen 78 Patienten eine aktive Erkrankung mit typischer Klinik von Schleimhaut- und ggf. auch Hauterosionen/-ulzerationen.

Bei 63 Patienten bestand zu den Zeitpunkten der Biopsieentnahme keine medikamentöse Therapie, 11 Patienten hingegen wurden bereits mit systemischen Immunsuppressiva behandelt oder erhielten eine immunmodulatorische Therapie. Weitere 4 Patienten wurden topisch mit Kortikosteroiden behandelt.

Der initiale DIF-Befund (einfacher oder multipler Biopsien) ergab in 8 von 11 Fällen mit systemischer Behandlung ein positives, bei 2 Patienten ein negatives und bei einem Patienten ein diskordantes Ergebnis. Unter lokaler Therapie war das Ergebnis der DIF bei 3 Patienten initial positiv und in einem Fall negativ. Demgegenüber waren bei den unbehandelten 63 Patienten in der ersten Untersuchung 56 der Biopsien zu Beginn DIF-positiv und 17 DIF-negativ.

4.1.4 Immunserologie

Zirkulierende Antikörper gegen BP180 konnten bei 48 von 78 Patienten detektiert werden. Acht Patienten zeigten Antikörper gegen Lam 332. Zudem gab es bei zwei Patienten eine kombinierte Reaktivität gegen BP180 und Lam 332 und bei weiteren zwei Patienten das kombinierte Auftreten von BP180- und BP230-spezifischen Autoantikörpern. Im Falle eines Patienten wurden Antikörper gegen Lam 332 und dem p200-Antigen gefunden (**Abbildung 6**).

Bei 8 Patienten konnte kein spezifisches Zielantigen ermittelt werden. Durch eine IIF wurden in diesen Fällen zirkulierende IgG- und/ oder IgA-Antikörper gegen die Basalmembran von NaCl-separierter normaler humaner Haut nachgewiesen. Im Serum der verbliebenen 9 Patienten gelang kein serologischer Nachweis von zirkulierenden Autoantikörpern (**Abbildung 6**).

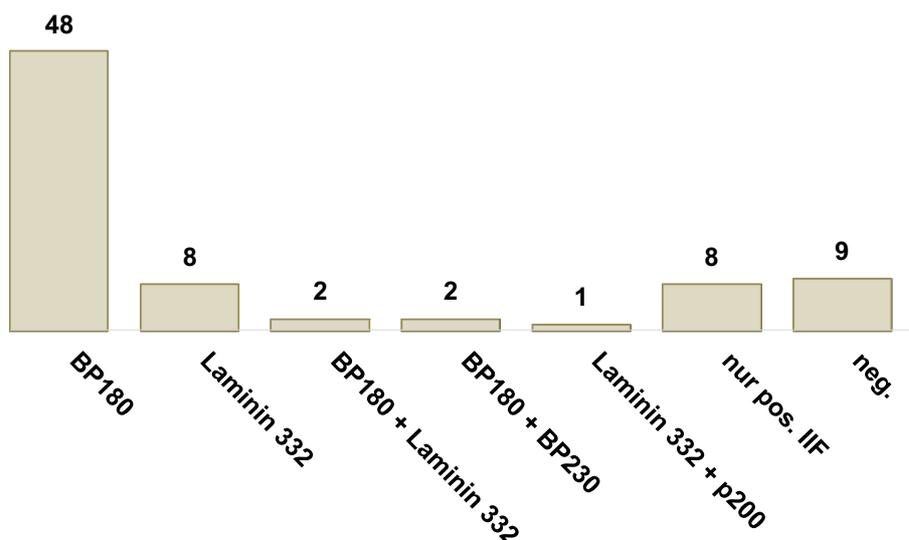


Abbildung 6: Immunserologische Befunde bei 78 Patienten mit Schleimhautpemphigoid

In der serologischen Untersuchung zeigten 69 von 78 Patienten eine Reaktivität gegen Bestandteile der mukokutanen Basalmembranzone, bei 9 Patienten blieb die Detektion von Antikörpern im Serum negativ (neg.). Acht von 78 Patienten hatten einen positiven (pos.) Nachweis von Autoantikörpern ausschließlich in der indirekten Immunfluoreszenz (IIF). Der Nachweis von zirkulierenden Autoantikörpern gegen spezifische Basalmembranbestandteile gelang in 61 von 78 Fällen. Bei 52 von diesen 61 Patienten fanden sich Antikörper gegen das bullöse-Pemphigoid-Antigen 180 (BP180). Bei jeweils zwei Patienten konnte zusätzlich zu BP180 eine Reaktivität gegen Laminin 332 oder das bullöse-Pemphigoid-Antigen 230 (BP230) nachgewiesen werden. Acht von 61 Patienten zeigten Autoantikörper gegen Laminin 332. Bei einem Patienten gelang zusätzlich zu Laminin 332-spezifischen Antikörpern der Nachweis einer Reaktivität gegen das p200-Antigen.

In 3 von 11 Fällen mit Autoantikörpern gegen Lam 332 bestand eine Assoziation zu einer neoplastischen Erkrankung. Beispielsweise fand sich bei jeweils einem

Patienten ein Adenokarzinom der Lunge, ein Urothelkarzinom der Blase und ein Cervixkarzinom.

Die Klinik des Patienten mit einer kombinierten Reaktivität gegen Lam 332 und dem p200-Antigen war besonders ausgeprägt. Er wies eine starke Blasenbildung an Händen und Füßen mit schwerem Befall der Mundschleimhaut, der Konjunktiven beider Augen und des Penis auf (**Patient 67, Tabelle 1**). Die weiteren 4 Patienten mit Reaktivitäten gegen mehrere spezifische Antigene hatten eine für das SHP gewöhnliche Klinik ohne Besonderheiten.

4.2 Sensitivität der Immunhistochemie beim Schleimhautpemphigoid

Aus unserem Patientenkollektiv von 78 Patienten mit SHP lag bei 33 Patienten (17 Männer und 16 Frauen im Alter von 23-90 Jahren, Median: 65 Jahre) zusätzlich zum Kryomaterial auch FFPE-Gewebe vor. Von diesen Patienten konnten insgesamt 48 Biopsien (33 aus der Schleimhaut, 15 aus der Haut) lichtmikroskopisch ausgewertet und immunhistochemisch aufgearbeitet werden. Die immunhistochemischen Färbungen wurden zum Nachweis von linearen Ablagerungen gegen C3d, C4d, IgG und IgA an der mukokutanen Basalmembranzzone durchgeführt.

4.2.1 Histopathologie

Die Histopathologie konnte von 48 Biopsien (31 aus der Mundschleimhaut, 15 aus der Haut und jeweils eine aus den Konjunktiven und aus dem Larynx) ausgewertet werden (**Tabelle 2**). Alle Gewebeproben zeigten gemischte Zellinfiltrate in der oberen Dermis/Submukosa, deren Dichte von sehr gering zu sehr dicht variierte. Eosinophile wurden in 11 Biopsien, Neutrophile in 9 Biopsien und Plasmazellen in 5 Biopsien gesehen. Eine subepitheliale Spaltbildung war in 24 Biopsien vorhanden. Zwei Gewebeproben zeigten eine Fibrose und in 9 Biopsien lag ein Ulkus vor.

4.2.2 Immunhistochemie für C3d und C4d

Die eingeschlossenen Gewebeproben wurden zum Nachweis von C3d und C4d immunhistochemisch gefärbt. Eine Übersicht dieser Analyse zeigt **Tabelle 2**. Lineare Ablagerungen von C3d wurden bei 21 von 48 Biopsien (44%) gesehen und 17 von 33 Patienten (52%) wiesen mindestens eine positive Biopsie für C3d auf. Lineare Ablagerungen von C4d wurden in 24 von 48 Biopsien (50%) detektiert und 19 von 33 Patienten (58%) hatten in mindestens einer Biopsie einen positiven Befund für C4d. Zwei Biopsien von 2 unterschiedlichen Patienten waren positiv für C3d, aber nicht für C4d. Fünf Gewebeproben von 5 verschiedenen Patienten waren positiv für C4d, aber negativ für C3d. Ein Patient, dessen DIF-Befund negativ blieb, hatte einen positiven Nachweis von C3d und C4d. Lineare Ablagerungen von C3d konnten in 11 von 33 Schleimhautbiopsien (33%) und in 10 von 15 Hautbiopsien (67%) gezeigt werden. Der Nachweis von C4d gelang in 14 von 33 Schleimhautbiopsien (42%) und in 10 von 15 Hautbiopsien (67%). Bei 8 von 22 Patienten (36%) mit mindestens einer Schleimhautbiopsie konnte C3d in der Mukosa nachgewiesen werden, bei 10 von 15 Patienten (67%) mit wenigstens einer Hautbiopsie wurde C3d in der Haut detektiert. Bei 10 von 22 Patienten (45%) mit mindestens einer Schleimhautbiopsie wurde C4d in der Mukosa gesehen und 10 von 15 Patienten (67%) mit mindestens einer Hautbiopsie zeigten Ablagerungen von C4d in ihrer Haut. Insgesamt konnten bei 26 von 48 Biopsien (54%) und 21 von 33 Patienten (64%) positive lineare Ablagerungen für C3d und/oder C4d in der immunhistochemischen Färbung nachgewiesen werden. **Abbildung 7** stellt exemplarisch die immunhistochemischen Färbungen an Gewebeproben von zwei Patienten mit SHP dar. Die Negativkontrollen zeigten keine spezifischen Ablagerungen für C3d oder C4d (**Abbildung 8**).

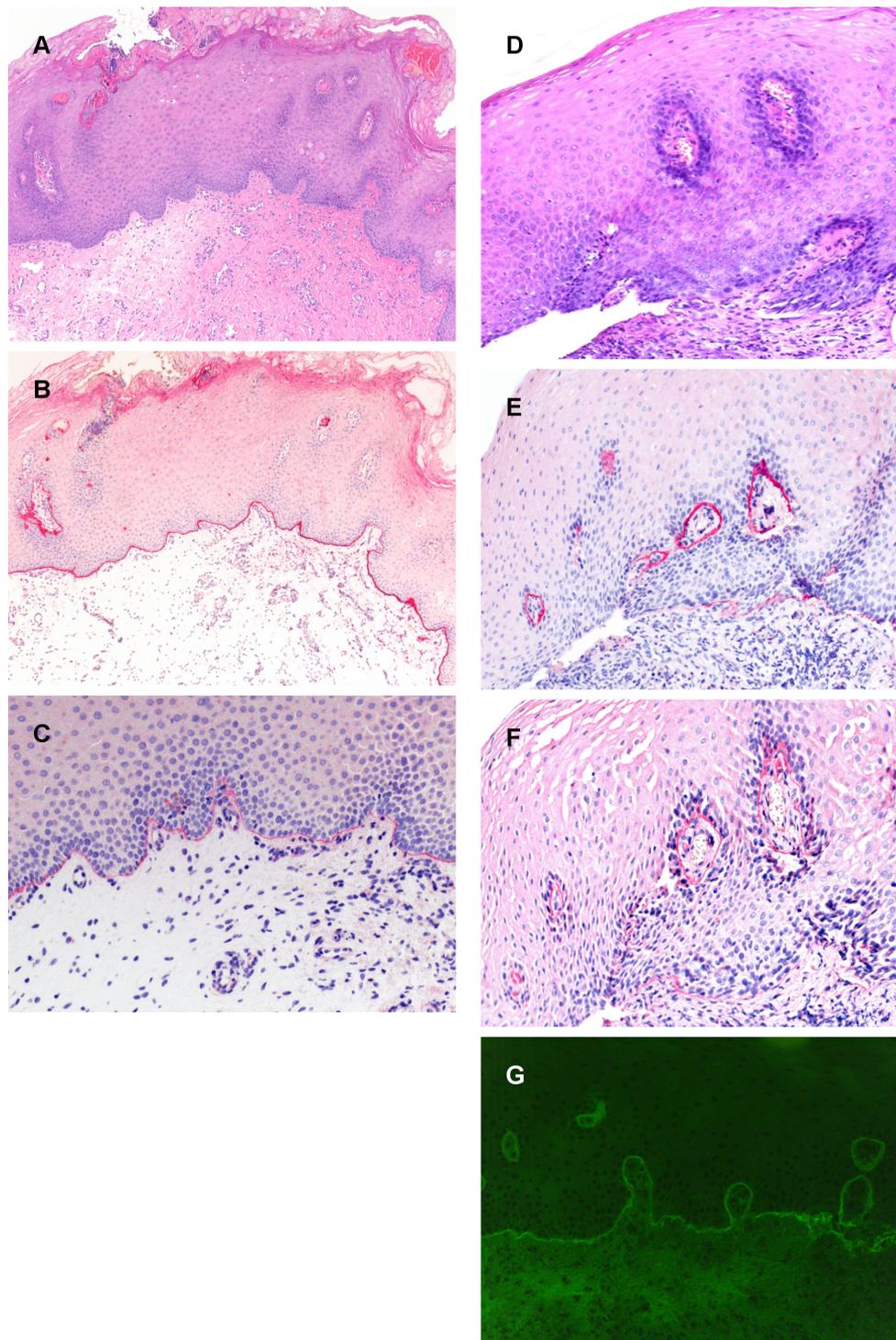


Abbildung 7: Immunhistochemischer Nachweis von Komplementablagerungen beim Schleimhautpemphigoid

Dargestellt ist ein Präparat aus der Mundschleimhaut des Patienten 27 aus Tabelle 2 (A, Hematoxylin-Eosin). Deutlich erkennbar sind die linearen Ablagerungen von C4d (B) und C3d (C) entlang der dermoepidermalen Junctionszone. Die direkte Immunfluoreszenz bei diesem Patienten war negativ. Zudem wird ein Biopsat der Mundschleimhaut von Patient 30 aus Tabelle 2 (D, Hematoxylin-Eosin) gezeigt. Eine lineare Ablagerung von C4d (E) und C3d (F) an der Basalmembranzzone ist gut sichtbar. Die korrespondierende direkte Immunfluoreszenz aus der Mundschleimhaut dieses Patienten zeigt ebenso lineare Ablagerungen an der Junctionszone von Komplementfaktor C3 (G).

Originalvergrößerung: A, B 100x, C-G 200x.

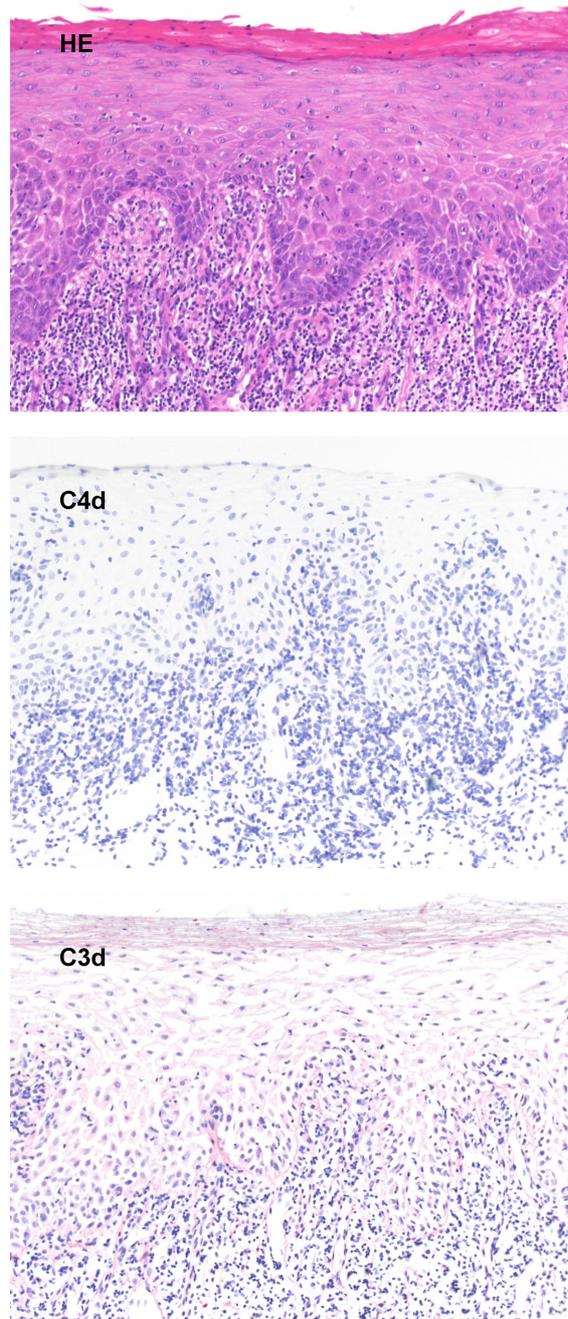


Abbildung 8: Immunhistochemische Reaktivität bei einem Patienten mit einem Lichen ruber der Mundschleimhaut

Es zeigen sich keine Ablagerungen von C3d oder C4d entlang der Basalmembran in der Mundschleimhautprobe eines Patienten mit Lichen ruber mucosae. Das mit Hematoxylin-Eosin (HE) gefärbte Präparat der Mundschleimhaut zeigt eine lichenoiden Interface-Dermatitis.

Originalvergrößerung 100x.

4.2.3 Immunhistochemie für IgG und IgA

Eine IgG- und/ oder IgA- Expression zeigte sich in der immunhistochemischen Färbung an läsionalen Biopsien von 5 Patienten mit SHP lediglich auf den Plasmazellen (**Tabelle 2**). Eine extrazelluläre Ablagerung dieser Immunglobuline entlang der mukokutanen Basalmembranzzone konnten wir weder an den Haut- und Schleimhautbiopsien unserer Patienten noch an den Positivkontrollen nachweisen, obwohl diese bereits in der DIF lineare Ablagerungen von IgG und/ oder IgA aufwiesen (**Abbildung 9**). Diese Ergebnisse blieben unverändert trotz verschiedener Verdünnungen und Inkubationszeiten der in dieser Arbeit eingesetzten Sekundärantikörper.

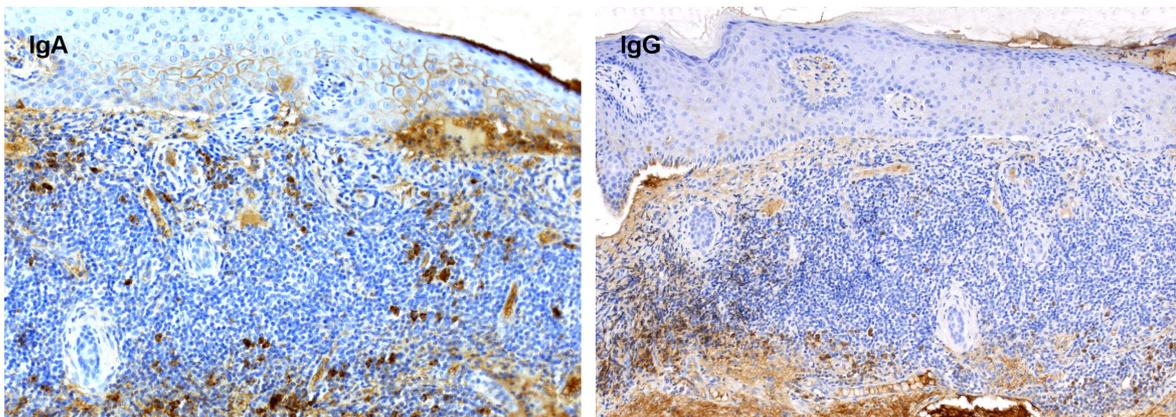


Abbildung 9: Immunhistochemische Reaktivität gegen IgG und IgA bei einem Patienten mit Schleimhautpemphigoid

Es lässt sich lediglich die Expression von IgG und IgA auf Plasmazellen am Paraffinmaterial einer Mundschleimhautbiopsie von Patient 27 (Tabelle 2) nachweisen. Eine lineare Ablagerung von Immunglobulinen an der mukokutanen Basalmembranzzone gelingt nicht, obwohl in der direkten Immunfluoreszenz dieses Patienten lineare Ablagerungen von Immunglobulinen nachweisbar sind.

Originalvergrößerung: IgA 200x, IgG 100x.

5 Diskussion

5.1 Sensitivität der direkten Immunfluoreszenz beim Schleimhautpemphigoid

Die DIF ist der Goldstandard in der Diagnostik des SHP [9]. Viele Studien zeigten bereits an großen Kollektiven von Patienten mit SHP, dass die Sensitivität dieser Methode bei Weitem nicht an 100% heranreicht. Als ein Beispiel ergab die Studie von Rogers & van Hale, dass 78% von 167 eingeschlossenen Patienten einen positiven DIF-Befund aufwiesen [45]. Helander & Rogers berichteten positive DIF-Befunde bei 68% von 81 Patienten [22] und Oyama et al. ermittelten eine Sensitivität der DIF von 82% bei 124 untersuchten Patienten [37]. Eine andere Studiengruppe schloss nur Patienten mit okulärem SHP ein und ermittelte eine Sensitivität von nur 56% [34]. Für eine sinnvolle Interpretation und Vergleichbarkeit dieser Daten muss bedacht werden, dass erst 2002 die diagnostischen Kriterien für das SHP durch die internationale Konsensuskonferenz festgelegt wurden [9]. Seitdem darf die definitive Diagnose eines SHP nicht mehr ohne einen positiven DIF-Befund gestellt werden. Da einige dieser Studien weit vor der Festlegung dieser Kriterien veröffentlicht wurden, bleibt beim Bewerten der Daten unklar, ob die als negativ gewerteten DIF-Befunde entweder falsch-negativ waren oder diese Patienten nach heutigen Kriterien eine andere Erkrankung als das SHP diagnostiziert bekämen.

In unserer Arbeit untersuchten wir die Sensitivität der DIF, indem wir nur Patienten mit dem typischen klinischen Phänotyp des SHP einschlossen, deren Diagnose letztendlich durch eine charakteristische DIF und/ oder durch den Nachweis von zirkulierenden Autoantikörpern gegen BP180 und/ oder Lam 332 bewiesen wurde.

5.1.1 Sensitivität der direkten Immunfluoreszenz bei Patienten, die einfach oder mehrfach biopsiert wurden

Die Sensitivität der DIF bei Patienten mit initial nur einer Biopsie betrug in unserem Patientenkollektiv 69%. Dieser Wert ist den in vorherigen Studien ermittelten Sensitivitäten ähnlich. Dies kann dadurch begründet sein, dass in den

früheren Arbeiten hauptsächlich Patienten mit nur einer Biopsie eingeschlossen wurden, wenn auch häufig eine Angabe über die exakte Anzahl der entnommenen Biopsien fehlte [3, 21, 22, 48]. Im Vergleich zu der Sensitivität von 69% hatten jene Patienten, denen im Rahmen der initialen Untersuchung zwei oder mehr Gewebeproben entnommen wurden, in 85% der Fälle mindestens einen positiven DIF-Befund. Unsere Daten zeigen, dass sich die Sensitivität der DIF multipler Biopsien erheblich von der Sensitivität singulärer Biopsien im Rahmen der ersten Untersuchung unterscheidet. Zudem waren 16 von 20 Patienten (80%), die anfangs eine oder mehrere negative Biopsien aufwiesen, bei späterer Wiederholung der DIF positiv. Bisher wurde der Effekt einer Wiederholung der DIF auf die Sensitivität dieser Methode nur in einer Studie von Thorne et al. an Patienten mit okulärem SHP berichtet [53]. Dabei hatten 43 von 54 Patienten (80%) einen positiven DIF-Befund, die initial eine einzelne konjunktivale Biopsie entnommen bekamen. Bei 11 zunächst negativ gebliebenen Patienten wurde die DIF im Verlauf anhand okulärer oder extraokulärer Biopsien wiederholt. Dabei konnte die Diagnose eines okulären SHP bei 9 Patienten aufgrund einer dann positiven DIF gestellt werden. Lediglich 2 Patienten blieben auch bei Wiederholung negativ. Unsere Daten bestätigen die Gültigkeit dieses Ansatzes für alle Formen des SHP und weisen darauf hin, dass multiple simultan oder sequentiell entnommene Biopsien die Sensitivität der DIF für diese Erkrankung erhöhen.

5.1.2 Übereinstimmung der Befunde der direkten Immunfluoreszenz bei Patienten, die mehrfach biopsiert wurden

Die Ursache der hohen Anzahl falsch-negativer Biopsien unserer Patienten mit SHP ist nicht eindeutig zu finden. Besonders interessant ist die Beobachtung, dass die Gewebeproben, die gleichzeitig von derselben Schleimhautlokalisierung entnommen und identisch verarbeitet wurden, diskordante Ergebnisse zeigen. Der Hauptgrund dafür kann in der vom Untersucher gewählten Lokalisation der Biopsieentnahme liegen, welche entweder zu dicht oder zu weit entfernt von der Läsion gelegen ist. Ein anderer oder zusätzlicher Faktor liegt möglicherweise auch in der unregelmäßigen Verteilung der Immunreaktanten in der Mukosa selbst. Generell wird empfohlen, dass eine Biopsie von normal erscheinender Mukosa 5-

10 mm entfernt von der klinisch manifesten Läsion entnommen werden sollte, weil die Immunreaktanten läsional durch die begleitende Entzündung bereits verdaut wurden und dadurch nicht mehr nachweisbar sind oder – bei zu weiter Entfernung von der Läsion – gar nicht vorhanden sind. In der klinischen Praxis müssen die technischen Probleme einer Biopsieentnahme aus einer schwer erreichbaren Schleimhautlokalisation und das Risiko einer weiteren Schädigung der betroffenen Konjunktiva oder Gingiva mit dem Nutzen der theoretisch idealen Stelle zur Probenentnahme abgewogen werden. Diese Überlegungen können einen Arzt dazu zwingen, sich doch nicht an die genannten Vorgaben für eine theoretisch ideale Lokalisation für die Gewebeentnahme zu halten. Dieser Konflikt kann für die hohe Anzahl falsch-negativer Biopsien mitverantwortlich sein. Im Widerspruch zu den bisher aufgeführten Argumenten wird in der Literatur beschrieben, dass die Immunreaktanten in der gesamten betroffenen Schleimhaut anwesend seien [48]. Im Falle eines okulären SHP sind diese sogar in der nicht betroffenen Mundschleimhaut sowie in der Haut der Patienten nachgewiesen worden [18, 34]. In der Tat fanden wir positive DIF-Befunde in der Mundschleimhaut von 3 Patienten mit rein okulärem SHP sowie in der Haut eines Patienten ohne kutane Beteiligung. Das SHP ist eine systemische Erkrankung, die durch zirkulierende und gewebsgebundene Autoantikörper gekennzeichnet ist, die gegen bestimmte Strukturproteine gerichtet sind, welche sich in der gesamten Haut und in allen oberflächlichen Schleimhäuten nachweisen lassen. Die Mechanismen, die bestimmte potentielle Manifestationsorte einer solchen Erkrankung vor Auftreten klinisch sichtbarer Läsionen dennoch schützen, sind unzureichend verstanden, könnten aber in bisher nicht genau bekannten örtlichen Faktoren liegen, die die zellvermittelte Entzündungsreaktion modulieren. Bei solchen Faktoren, die letztendlich darüber entscheiden, ob ein bestimmtes Zielgewebe vom SHP betroffen sein wird, könnte es sich z. B. um ein lokales Gleichgewicht zwischen autoreaktiven und regulatorischen T-Zellen handeln [13].

Wird die Biopsie andererseits zu nah an der klinisch erscheinenden Läsion entnommen, können die Immunreaktanten bereits durch den Entzündungsvorgang verdaut sein. Um diese Fehlerquelle zu eliminieren, wurden alle Biopsien, die mikroskopisch eine dermoepidermale Spaltbildung aufwiesen oder bei denen das Epithel fehlte, von unserer Studie ausgeschlossen.

Für die Mundschleimhautbiopsien wurde nicht nur der Abstand der Biopsie zur Läsion, sondern auch die Güte verschiedener Lokalisationen innerhalb der Mundschleimhaut verglichen. Helander & Rogers zeigten in ihrer Arbeit, dass die Gingiva das sensitivste Probenmaterial liefert [22]. Daher empfahlen sie diese Lokalisation zur bevorzugten Biopsieentnahme, sofern die Gingiva betroffen sei. Zu gegenteiligen Ergebnissen kamen andere Untersuchungen, die die Gingiva als einen ungünstigeren Ort für eine Gewebeentnahme einstufen, da diese zu unspezifischen entzündlichen Veränderungen neigt [12, 18, 48]. Leider war die exakte Lokalisation der Biopsie in der Mundhöhle nur bei den wenigsten unserer eingeschlossenen Patienten dokumentiert. Somit können wir keine Aussage über deren Auswirkung auf die Sensitivität der DIF bei unseren Patienten treffen.

Die vorliegenden Daten empfinden wir als repräsentativ für eine Hautklinik, die einen Schwerpunkt auf bullöse Autoimmundermatosen legt und somit Routine in der Diagnostik dieser seltenen Erkrankungen hat. Die Rate an falsch-negativen DIF-Ergebnissen ist bei Ärzten ohne große Erfahrung im Umgang mit dem SHP vermutlich höher als unsere Daten zeigen. Unsere Beobachtung von diskordanten DIF-Befunden in multiplen periläsionalen Biopsien kann Hinweise darauf geben, dass die Ergebnisse der DIF eines Patienten mit SHP stärker variieren als zuvor gedacht, was möglicherweise an der genauen Lokalisation der Gewebeentnahme liegt. Bereits bei der ersten Untersuchung mehrere Biopsien für eine DIF zu entnehmen, kann demnach eine einfache und praktische Möglichkeit darstellen, falsch-negative DIF-Resultate zu vermeiden (und damit falsche diagnostische Rückschlüsse zu ziehen) und die Sensitivität der DIF für das SHP zu erhöhen.

5.1.3 Befunde der direkten Immunfluoreszenz und immunsuppressive Therapie

Zum Zeitpunkt der initialen Biopsie erhielten 15 von 78 Patienten aus unserem Kollektiv bereits eine systemische (11 Patienten) oder topische (4 Patienten) Behandlung. Da alle untersuchten Patienten zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme eine Krankheitsaktivität mit typischer Klinik aufwiesen, konnte durch die Therapie keine Krankheitskontrolle erfolgen. Interessanterweise war bei 12 von 15 Patienten (80%) das Ergebnis der initialen DIF positiv, während 3 von 20 Patienten (15%) mit falsch-negativer DIF unter Therapie waren. Daraus ist abzuleiten, dass eine ineffektive Therapie keinen wesentlichen Einfluss auf das

Ergebnis der DIF hat und damit die hohe Anzahl der von uns beobachteten falsch-negativen Ergebnisse der DIF nicht ausreichend erklären kann.

5.1.4 Immunserologie

Zirkulierende Autoantikörper gegen verschiedene Bestandteile der Basalmembran wurden bei bis zu 75% der Patienten mit SHP gefunden [37]. Der Antikörpertiter ist i. d. R. allerdings niedrig. Wir benutzten verschiedene rekombinante und native Antigene und wiesen Reaktivitäten gegen BP180 oder Lam 332 bei 61 von 78 Patienten (78%) mit SHP nach. Interessanterweise wurden in dem Serum von 4 Patienten ebenso Autoantikörper gegen BP180 gefunden, die auch bei Wiederholung der DIF ein negatives Ergebnis aufwiesen. Diese Beobachtung zeigt, dass die Bestimmung autoantigenspezifischer zirkulierender Antikörper aus dem Serum der Patienten eine geeignete, hilfreiche Methode zur Diagnosesicherung des SHP darstellt, sofern ein passender klinischer Befund vorliegt. Die pathogenetische Relevanz von Antikörpern gegen BP180 oder Lam 332 ist in verschiedenen in vivo und in vitro Modellen gezeigt worden [50].

5.2 Sensitivität der Immunhistochemie beim Schleimhautpemphigoid

In den vergangenen Jahren haben einige Studien untersucht, ob eine IHC an FFPE-Gewebe eine geeignete Methode in der Diagnostik verschiedener blasenbildender Autoimmundermatosen darstellt. Zumeist war das BP oder der Pemphigus Mittelpunkt der Untersuchungen [11, 20, 25, 32, 54, 56]. Zwei ältere Studien nutzten hingegen Kryoschnitte konjunktivaler Biopsien von Patienten mit okulärem SHP für eine immunhistochemische Untersuchung [15, 40]. Allerdings wurde bisher nicht der Nutzen einer IHC an FFPE-Gewebe an einem größeren Patientenkollektiv mit SHP untersucht. Wir testeten diese Färbemethode an 33 von 78 in unsere Studie eingeschlossenen Patienten, für die geeignetes FFPE-Gewebe vorlag. Dafür nutzten wir Antikörper zum Nachweis linearer Ablagerungen der Komplementfaktoren C3d und C4d sowie der Immunglobuline IgG und IgA an der mukokutanen Basalmembranzone.

5.2.1 Immunhistochemie für C3d und C4d

Die IHC für C3d und C4d ergab jeweils eine Sensitivität von circa 50% mit leichtem Vorteil für den Nachweis des Komplementfaktors C4d. Einige unserer Patienten zeigten Ablagerungen für C4d aber nicht für C3d und ebenso andersherum, womit die Gesamtsensitivität bei Nutzung beider Färbungen ansteigt. Darüber hinaus zeigt sich, dass die Nachweiswahrscheinlichkeit von C3d (33%) und C4d (42%) an der Mukosa deutlich niedriger war als die an der Haut (C3d und C4d: jeweils 67%). Dies kann dadurch begründet werden, dass die Hautbiopsien aus technischen und anatomischen Gründen meist größer und stabiler sind, als die Schleimhautbiopsien. Basierend auf unseren Ergebnissen kann empfohlen werden, zunächst eine immunhistochemische Färbung gegen den Komplementfaktor C4d durchzuführen und bei negativem Ergebnis im Anschluss additiv auch auf die Ablagerung von C3d zu untersuchen.

In den vergangenen Studien variierte die Sensitivität der IHC gegen C3d/C4d bei Patienten mit BP von 37-100% erheblich [11, 20, 25, 32, 39, 54]. Für Pemphigus-Erkrankungen waren die Angaben der Sensitivität konstanter und lagen zwischen 77-82% [32, 54]. Diese Unterschiede mögen durch unterschiedliche Kriterien des Patienteneinschlusses oder durch verschiedene Protokolle der Laboratorien für die immunhistochemische Färbung begründet sein.

Ähnlich zu anderen bullösen Autoimmundermatosen ist die Sensitivität der IHC für C3d und C4d an FFPE-Gewebe beim SHP niedriger als die einer DIF. Dies konnte anhand der Auswertung dieser Studie gezeigt werden. Dennoch kann der Gebrauch der IHC an FFPE-Gewebe in jenen Fällen wichtig sein, in denen klinisch nicht an die Differentialdiagnose einer bullösen Autoimmundermatose gedacht wurde und/ oder die behandelnden Ärzte mit der Diagnostik dieser seltenen Erkrankungen nicht vertraut sind und daher kein Kryomaterial für eine DIF gewonnen wurde.

Unsere Daten zeigen, dass eine immunhistochemische Färbung gegen C3d oder C4d an FFPE-Gewebe die Diagnose eines SHP in vielen Fällen bestätigen kann. Dies kann insbesondere dann von großem Nutzen sein, wenn ein Dermatopathologe mit einer Schleimhaut- oder Hautbiopsie konfrontiert wird, an der keine definitive Diagnose gestellt werden konnte. Wenn diese Biopsie eine intakte Basalmembranzzone aufweist, sollte eine immunhistochemische Färbung

gegen C3d und/ oder C4d ergänzt werden. Dies könnte auf lange Sicht Kosten und Zeit sparen, da eine positive IHC zusammen mit einer passenden Klinik eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines SHP ergibt. Ein negatives Ergebnis kann hingegen die Erkrankung nicht ausschließen und muss bei weiterbestehendem klinischen Verdacht zu einer oder zu mehreren zusätzlichen DIF-Untersuchungen an gefrorenem Material Anlass geben. Zusätzlich ist zu bedenken, dass auch bei positiver IHC für C3d und/ oder C4d eine zusätzliche DIF sinnvoll sein kann, um abgelagerte Immunglobulinklassen zu bestimmen.

Neben den bereits beschriebenen technischen Schwierigkeiten bei der Entnahme insbesondere von Schleimhautbiopsien, kann die geringe Sensitivität der immunhistochemischen Färbung auch darin begründet sein, dass die Biopsien für eine Histopathologie gewöhnlich läsional entnommen werden. In Folge des entzündlichen Prozesses können Immunablagerungen bereits teilweise oder komplett durch den Entzündungsvorgang abgebaut worden sein [35]. Die DIF hingegen wird an einer perilesional, also normal erscheinenden Haut- oder Schleimhautbiopsie durchgeführt, an der klinisch keine akute Entzündung besteht und daher die Nachweiswahrscheinlichkeit der Immunablagerungen höher ist. Dies kann die höhere Sensitivität der DIF gegenüber der IHC begründen.

Eine weitere nennenswerte Beobachtung unserer Studie ist, dass bei 3 von 9 Patienten eine lineare Ablagerung von C3d und/ oder C4d an der mukokutanen Basalmembran bestand, welche in der DIF lediglich Ablagerungen von Immunglobulinen im Zielgewebe aufwies. Daraus ist abzuleiten, dass ein positives Ergebnis einer IHC mit Antikörpern gegen Komplement C3d und/ oder C4d nicht auszuschließen ist, wenn in der DIF lediglich Immunglobuline nachgewiesen wurden.

5.2.2 Immunhistochemie für IgG und IgA

Da einige der Patienten mit SHP tatsächlich nur Ablagerungen von Immunglobulinen und keine Ablagerungen von Komplementfaktoren aufweisen, könnte die Sensitivität der IHC auch dadurch gesteigert werden, wenn ein zuverlässiges Färbeprotokoll zur Detektion von IgG und IgA an FFPE-Gewebe verfügbar wäre. Zwei frühere Studien berichteten über einen erfolgreichen Nachweis von IgG oder IgG4 in der Haut von Patienten mit BP oder Pemphigus

[20, 56]. Unsere Studie sowie auch eine andere Arbeitsgruppe konnte hingegen keine Ablagerungen von IgG oder IgA an der mukokutanen Basalmembran nachweisen [32]. Auch die verwendeten Positivkontrollen, die mittels DIF gesicherte Ablagerungen von Immunglobulinen aufwiesen, waren in der IHC negativ.

Bemerkenswerterweise gelang der Nachweis von Immunglobulinen auf den Plasmazellen von 5 Biopsien unserer Patienten mit SHP, die in der Histopathologie diese Zellen aufwiesen. Warum zwischen den Immunglobulinen auf Plasmazellen und den Immunglobulinen an der mukokutanen Basalmembran eine Diskrepanz besteht, bleibt unklar und muss durch weitere Studien untersucht werden. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Dichte der Immunglobuline, die von Plasmazellen exprimiert wird um ein Vielfaches höher ist, als die der abgelagerten Immunglobuline an der mukokutanen Basalmembran im Rahmen eines entzündlichen Prozesses.

Zusammenfassend konnten wir anhand unserer Daten zeigen, dass multiple und wiederholte Biopsien die Sensitivität der DIF in der Diagnostik des SHP verbessern und eine initial negative DIF ein SHP nicht ausschließt. Außerdem untersuchten wir erstmalig die Sensitivität der Immunhistochemie am Paraffinmaterial und konnten zeigen, dass der Nachweis von C3d und C4d eine prinzipiell geeignete Screening-Methode für die Diagnose eines SHP darstellt.

6 Zusammenfassung

Das Schleimhautpemphigoid (SHP) ist eine subepidermal blasenbildende Autoimmundermatose, die klinisch durch einen bevorzugten Befall der Schleimhäute gekennzeichnet ist. Der Goldstandard in der Diagnostik dieser Erkrankung ist die direkte Immunfluoreszenz (DIF) an einer gefrorenen periläsional entnommenen Biopsie mit dem Nachweis von linearen Ablagerungen von IgG, IgA und/ oder Komplement C3 entlang der mukokutanen Basalmembran. In der klinischen Routine ist aufgefallen, dass die initiale DIF nicht selten ein falsch-negatives Ergebnis aufweist und somit die Diagnose eines SHP verzögert. Mit dieser Arbeit wollten wir daher den Einfluss von initial mehrfachen oder im Verlauf wiederholten Biopsien auf die Sensitivität der DIF untersuchen.

Zudem steht häufig nur eine läsional entnommene, in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Biopsie zur Verfügung, da bei chronisch-erosiven Schleimhautveränderungen die Differentialdiagnose eines SHP nicht immer bedacht wird bzw. der betreuende Arzt mit der genauen Diagnostik dieser seltenen Erkrankung nicht vertraut ist. An einem solchen Material kann zwar eine histopathologische und immunhistochemische Untersuchung, nicht aber eine DIF durchgeführt werden. Wir untersuchten daher die Sensitivität der Immunhistochemie zum Nachweis von im Bereich der Basalmembran abgelagerten Immunreaktanten zwecks Diagnosesicherung des SHP und verglichen diese mit der Sensitivität der DIF.

Hierzu haben wir die Befunde der DIF von 136 periläsional entnommenen Biopsien von 78 Patienten mit immunpathologisch gesichertem SHP retrospektiv untersucht. Für 33 von diesen 78 Patienten lagen zusätzlich zum Kryomaterial insgesamt 48 in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Biopsien vor. Diese wurden immunhistochemisch für C3d, C4d, IgG und IgA gefärbt.

Die DIF bei initial nur einer einzigen Biopsie ergab ein positives Ergebnis bei 36 von 52 Patienten (69%). In 13 Fällen war die initial singuläre Biopsie DIF-negativ, während spätere, wiederholte Biopsien positiv ausfielen. Bei 22 von 26 Patienten (85%), bei denen zu Beginn multiple Biopsien für eine DIF entnommen wurden, war mindestens eine DIF positiv. Interessanterweise zeigten simultan entnommene Biopsien bei 11 von 32 Patienten diskordante Ergebnisse.

Insgesamt konnte bei 74 von 78 aller Patienten (95%) mindestens ein positives Ergebnis der DIF nachgewiesen werden. In den verbliebenden 4 Fällen wurde die Diagnose bei passender Klinik anhand des Nachweises von zirkulierenden Antikörpern gegen BP180 gestellt.

Unsere Untersuchungen zur Immunhistochemie (IHC) zeigten lineare Ablagerungen von C3d bei 21 von 48 (44%) der Biopsien. Siebzehn von 33 (52%) der Patienten hatten lineare Ablagerungen von C3d in mindestens einer Gewebeprobe. In 24 von 48 (50%) der Biopsien wiesen wir lineare Ablagerungen gegen C4d nach und 19 von 33 (58%) der Patienten hatten in mindestens einer Gewebeprobe lineare Ablagerungen von C4d. Insgesamt konnten bei 26 von 48 (54%) der Biopsien und bei 21 von 33 (64%) der untersuchten Patienten lineare Ablagerungen von C3d und/ oder C4d nachgewiesen werden. Dabei war die Sensitivität von Schleimhautbiopsien geringer als die der Hautproben. Ablagerungen von IgG oder IgA an der mukokutanen Basalmembran konnten in keiner Biopsie nachgewiesen werden.

Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass mehrfache simultane oder wiederholte Biopsien die Sensitivität der DIF in der Diagnostik eines SHP steigern. Der verzögerte Beginn einer immunsuppressiven Therapie sowie die Behandlung bei unsicherer Diagnose bergen potentielle Risiken für die Patienten, sodass wir bei einer initial negativen DIF mit klinisch verdächtigem Befund zeitnah eine Wiederholung der DIF empfehlen. Zudem konnten wir zeigen, dass die IHC zum Nachweis von C4d und C3d an in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe bei Verdacht auf ein SHP eine geeignete Screening-Methode zur Diagnose dieser Erkrankung darstellt, insbesondere dann, wenn kein Kryomaterial für eine DIF vorliegt. Ein negatives Ergebnis der IHC schließt jedoch das Vorliegen eines SHP nicht aus und sollte bei fortbestehendem klinischen Verdacht eine DIF nach sich ziehen. Für den Nachweis von IgG oder IgA an der mukokutanen Basalmembran ist die IHC derzeit nicht geeignet.

7 Literaturverzeichnis

1. Ahmed AR, Kurgis BS, Rogers RS, 3rd: Cicatricial pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 24, 987-1001 (1991)
2. Balding SD, Prost C, Diaz LA, Bernard P, Bedane C, Aberdam D, Giudice GJ: Cicatricial pemphigoid autoantibodies react with multiple sites on the BP180 extracellular domain. *J Invest Dermatol* 106, 141-146 (1996)
3. Bean SF: Cicatricial pemphigoid. Immunofluorescent studies. *Arch Dermatol* 110, 552-555 (1974)
4. Bernard P, Vaillant L, Labeille B, Bedane C, Arbeille B, Denoeux JP, Lorette G, Bonnetblanc JM, Prost C: Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group. *Arch Dermatol* 131, 48-52 (1995)
5. Bertram F, Brocker EB, Zillikens D, Schmidt E: Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *J Dtsch Dermatol Ges* 7, 434-440 (2009)
6. Blocker IM, Dahnrich C, Probst C, Komorowski L, Saschenbrecker S, Schlumberger W, Stocker W, Zillikens D, Schmidt E: Epitope mapping of BP230 leading to a novel enzyme-linked immunosorbent assay for autoantibodies in bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 166, 964-970 (2012)
7. Bruckner-Tuderman L, Zillikens D: Blasen bildende Erkrankungen. In: Plewig P, Landthaler M, Burgdorf WHC, Hertl M, Ruzicka T (Hrsg.): *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*. 6. Aufl., Springer, Berlin Heidelberg, 2012
8. Carrozzo M, Fasano ME, Broccoletti R, Carbone M, Cozzani E, Rendine S, Roggero S, Parodi A, Gandolfo S: HLA-DQB1 alleles in Italian patients with

mucous membrane pemphigoid predominantly affecting the oral cavity. *Br J Dermatol* 145, 805-808 (2001)

9. Chan LS, Ahmed AR, Anhalt GJ, Bernauer W, Cooper KD, Elder MJ, Fine JD, Foster CS, Ghohestani R, Hashimoto T, Hoang-Xuan T, Kirtschig G, Korman NJ, Lightman S, Lozada-Nur F, Marinkovich MP, Mondino BJ, Prost-Squarcioni C, Rogers RS, 3rd, Setterfield JF, West DP, Wojnarowska F, Woodley DT, Yancey KB, Zillikens D, Zone JJ: The first international consensus on mucous membrane pemphigoid: definition, diagnostic criteria, pathogenic factors, medical treatment, and prognostic indicators. *Arch Dermatol* 138, 370-379 (2002)
10. Chan RY, Bhol K, Tesavibul N, Letko E, Simmons RK, Foster CS, Ahmed AR: The role of antibody to human beta4 integrin in conjunctival basement membrane separation: possible in vitro model for ocular cicatricial pemphigoid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 2283-2290 (1999)
11. Chandler W, Zone J, Florell S: C4d immunohistochemical stain is a sensitive method to confirm immunoreactant deposition in formalin-fixed paraffin-embedded tissue in bullous pemphigoid. *J Cutan Pathol* 36, 655-659 (2009)
12. Daniels TE, Quadra-White C: Direct immunofluorescence in oral mucosal disease: a diagnostic analysis of 130 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 51, 38-47 (1981)
13. Dart JK: The 2016 Bowman Lecture Conjunctival curses: scarring conjunctivitis 30 years on. *Eye* 31, 301-332 (2017)
14. Delgado JC, Turbay D, Yunis EJ, Yunis JJ, Morton ED, Bhol K, Norman R, Alper CA, Good RA, Ahmed R: A common major histocompatibility complex class II allele HLA-DQB1* 0301 is present in clinical variants of pemphigoid. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 8569-8571 (1996)

15. Demers PE, Robin H, Prost C, Toutblanc M, Hoang-Xuan T: Immunohistopathologic testing in patients suspected of ocular cicatricial pemphigoid. *Curr Eye Res* 17, 823-827 (1998)
16. Drouet M, Delpuget-Bertin N, Vaillant L, Chauchaix S, Boulanger MD, Bonnetblanc JM, Bernard P: HLA-DRB1 and HLA-DQB1 genes in susceptibility and resistance to cicatricial pemphigoid in French Caucasians. *Eur J Dermatol* 8, 330-333 (1998)
17. Egan CA, Lazarova Z, Darling TN, Yee C, Cote T, Yancey KB: Anti-epiligrin cicatricial pemphigoid and relative risk for cancer. *Lancet* 357, 1850-1851 (2001)
18. Fleming TE, Korman NJ: Cicatricial pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 43, 591-574 (2000)
19. Ghohestani RF, Nicolas JF, Rousselle P, Claudy AL: Diagnostic value of indirect immunofluorescence on sodium chloride-split skin in differential diagnosis of subepidermal autoimmune bullous dermatoses. *Arch Dermatol* 133, 1102-1107 (1997)
20. Glauser S, Rutz M, Cazzaniga S, Hegyi I, Borradori L, Beltraminelli H: Diagnostic value of immunohistochemistry on formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsy specimens for bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 175, 988-993 (2016)
21. Griffith MR, Fukuyama K, Tuffanelli D, Silverman S, Jr.: Immunofluorescent studies in mucous membrane pemphigoid. *Arch Dermatol* 109, 195-199 (1974)
22. Helander SD, Rogers RS, 3rd: The sensitivity and specificity of direct immunofluorescence testing in disorders of mucous membranes. *J Am Acad Dermatol* 30, 65-75 (1994)

23. Hirako Y, Usukura J, Uematsu J, Hashimoto T, Kitajima Y, Owaribe K: Cleavage of BP180, a 180-kDa bullous pemphigoid antigen, yields a 120-kDa collagenous extracellular polypeptide. *J Biol Chem* 273, 9711-9717 (1998)
24. Kirtschig G, Marinkovich MP, Burgeson RE, Yancey KB: Anti-basement membrane autoantibodies in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid bind the alpha subunit of laminin 5. *J Invest Dermatol* 105, 543-548 (1995)
25. Kwon EJ, Ntiamoah P, Shulman KJ: The utility of C4d immunohistochemistry on formalin-fixed paraffin-embedded tissue in the distinction of polymorphic eruption of pregnancy from pemphigoid gestationis. *Am J Dermatopathol* 35, 787-791 (2013)
26. Lazarova Z, Hsu R, Yee C, Yancey KB: Human anti-laminin 5 autoantibodies induce subepidermal blisters in an experimental human skin graft model. *J Invest Dermatol* 114, 178-184 (2000)
27. Lazarova Z, Sitaru C, Zillikens D, Yancey KB: Comparative analysis of methods for detection of anti-laminin 5 autoantibodies in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 51, 886-892 (2004)
28. Lazarova Z, Yee C, Darling T, Briggaman RA, Yancey KB: Passive transfer of anti-laminin 5 antibodies induces subepidermal blisters in neonatal mice. *J Clin Invest* 98, 1509-1518 (1996)
29. Lee JB, Liu Y, Hashimoto T: Cicatricial pemphigoid sera specifically react with the most C-terminal portion of BP180. *J Dermatol Sci* 32, 59-64 (2003)
30. Lever WF: Pemphigus. *Medicine (Baltimore)* 32, 1-123 (1953)
31. Lüllmann-Rauch R, Asan E (Hrsg.): Haut und Hautanhangsgebilde. In: Taschenlehrbuch Histologie. 5. Aufl., 580-600, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2015

32. Magro CM, Dyrsen ME: The use of C3d and C4d immunohistochemistry on formalin-fixed tissue as a diagnostic adjunct in the assessment of inflammatory skin disease. *J Am Acad Dermatol* 59, 822-833 (2008)
33. Marinkovich MP, Taylor TB, Keene DR, Burgeson RE, Zone JJ: LAD-1, the linear IgA bullous dermatosis autoantigen, is a novel 120-kDa anchoring filament protein synthesized by epidermal cells. *J Invest Dermatol* 106, 734-738 (1996)
34. Mehra T, Guenova E, Dechent F, Wurth F, Zierhut M, Rocken M, Schaller M, Deuter C: Diagnostic relevance of direct immunofluorescence in ocular mucous membrane pemphigoid. *J Dtsch Dermatol Ges* 13, 1268-1274 (2015)
35. Mutasim DF, Adams BB: Immunofluorescence in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 45, 803-822 (2001)
36. Nayar M, Wojnarowska F, Venning V, Taylor CJ: Association of autoimmunity and cicatricial pemphigoid: is there an immunogenetic basis? *J Am Acad Dermatol* 25, 1011-1015 (1991)
37. Oyama N, Setterfield JF, Powell AM, Sakuma-Oyama Y, Albert S, Bhogal BS, Vaughan RW, Kaneko F, Challacombe SJ, Black MM: Bullous pemphigoid antigen II (BP180) and its soluble extracellular domains are major autoantigens in mucous membrane pemphigoid: the pathogenic relevance to HLA class II alleles and disease severity. *Br J Dermatol* 154, 90-98 (2006)
38. Pas HH, Kloosterhuis GJ, Heeres K, van der Meer JB, Jonkman MF: Bullous pemphigoid and linear IgA dermatosis sera recognize a similar 120-kDa keratinocyte collagenous glycoprotein with antigenic cross-reactivity to BP180. *J Invest Dermatol* 108, 423-429 (1997)
39. Pfaltz K, Mertz K, Rose C, Scheidegger P, Pfaltz M, Kempf W: C3d immunohistochemistry on formalin-fixed tissue is a valuable tool in the

diagnosis of bullous pemphigoid of the skin. *J Cutan Pathol* 37, 654-658 (2010)

40. Power WJ, Neves RA, Rodriguez A, Dutt JE, Foster CS: Increasing the diagnostic yield of conjunctival biopsy in patients with suspected ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology* 102, 1158-1163 (1995)
41. Radford CF, Rauz S, Williams GP, Saw VP, Dart JK: Incidence, presenting features, and diagnosis of cicatrising conjunctivitis in the United Kingdom. *Eye* 26, 1199-1208 (2012)
42. Rashid KA, Gurcan HM, Ahmed AR: Antigen specificity in subsets of mucous membrane pemphigoid. *J Invest Dermatol* 126, 2631-2636 (2006)
43. Rashid KA, Stern JN, Ahmed AR: Identification of an epitope within human integrin alpha 6 subunit for the binding of autoantibody and its role in basement membrane separation in oral pemphigoid. *J Immunol* 176, 1968-1977 (2006)
44. Rogers RS, 3rd, Perry HO, Bean SF, Jordon RE: Immunopathology of cicatricial pemphigoid: studies of complement deposition. *J Invest Dermatol* 68, 39-43 (1977)
45. Rogers RS, 3rd, Van Hale HM: Immunopathologic diagnosis of oral mucosal inflammatory diseases. *Australas J Dermatol* 27, 51-57 (1986)
46. Rose C, Pfaltz M, Kempf W: C3D Immunohistochemistry on Formalin-Fixed Biopsies in Mucous Membrane Pemphigoid. *Am J Dermatopathology* 33, 204-225 (2011)
47. Sadler E, Lazarova Z, Sarasombath P, Yancey KB: A widening perspective regarding the relationship between anti-epiligrin cicatricial pemphigoid and cancer. *J Dermatol Sci* 47, 1-7 (2007)

48. Sano MS, Quarracino MC, Aguas SC, González EJ, Harada L, Krupitzki H, Mordoh A: Sensitivity of direct immunofluorescence in orals diseases. Study of 125 cases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 13, 287-291 (2008)
49. Schmidt E, Skrobek C, Kromminga A, Hashimoto T, Messer G, Brocker EB, Yancey KB, Zillikens D: Cicatricial pemphigoid: IgA and IgG autoantibodies target epitopes on both intra- and extracellular domains of bullous pemphigoid antigen 180. *Br J Dermatol* 145, 778-783 (2001)
50. Schmidt E, Zillikens D: Pemphigoid diseases. *Lancet* 381, 320-332 (2013)
51. Setterfield J, Theron J, Vaughan RW, Welsh KI, Mallon E, Wojnarowska F, Challacombe SJ, Black MM: Mucous membrane pemphigoid: HLA-DQB1*0301 is associated with all clinical sites of involvement and may be linked to antibasement membrane IgG production. *Br J Dermatol* 145, 406-414 (2001)
52. Sitaru C, Dahnrich C, Probst C, Komorowski L, Blocker I, Schmidt E, Schlumberger W, Rose C, Stocker W, Zillikens D: Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies. *Exp Dermatol* 16, 770-777 (2007)
53. Thorne JE, Anhalt GJ, Jabs DA: Mucous membrane pemphigoid and pseudopemphigoid. *Ophthalmology* 111, 45-52 (2004)
54. Villani AP, Chouvet B, Kanitakis J: Application of C4d Immunohistochemistry on Routinely Processed Tissue Sections for the Diagnosis of Autoimmune Bullous Dermatoses. *Am J Dermatopathology* 38, 186-188 (2016)
55. Yunis JJ, Mobini N, Yunis EJ, Alper CA, Deulofeut R, Rodriguez A, Foster CS, Marcus-Bagley D, Good RA, Ahmed AR: Common major histocompatibility complex class II markers in clinical variants of cicatricial pemphigoid. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 7747-7751 (1994)

56. Zhang X, Hyjek E, Soltani K, Petronic-Rosic V, Shea CR: Immunohistochemistry for immunoglobulin G4 on paraffin sections for the diagnosis of pemphigus. *Arch Pathol Lab Med* 136, 1402-1407 (2012)
57. Zillikens D, Kawahara Y, Ishiko A, Shimizu H, Mayer J, Rank CV, Liu Z, Giudice GJ, Tran HH, Marinkovich MP, Brocker EB, Hashimoto T: A novel subepidermal blistering disease with autoantibodies to a 200-kDa antigen of the basement membrane zone. *J Invest Dermatol* 106, 1333-1338 (1996)
58. Zillikens D, Kawahara Y, Ishiko A, Shimizu H, Mayer J, Rank CV, Liu Z, Giudice GJ, Tran HH, Marinkovich MP, Brocker EB, Hashimoto T: A novel subepidermal blistering disease with autoantibodies to a 200-kDa antigen of the basement membrane zone. *J Invest Dermatol* 106, 465-470 (1996)
59. Zillikens D, Mascaro JM, Rose PA, Liu Z, Ewing SM, Caux F, Hoffmann RG, Diaz LA, Giudice GJ: 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 (1997)
60. Zone JJ, Taylor TB, Meyer LJ, Petersen MJ: The 97 kDa linear IgA bullous disease antigen is identical to a portion of the extracellular domain of the 180 kDa bullous pemphigoid antigen, BPAg2. *J Invest Dermatol* 110, 207-210 (1998)

8 Anhang

Tabelle 1: Demographie, Klinik, Immunpathologie und Serologie von Patienten mit Schleimhautpemphigoid

Nr.	Alter	Geschlecht	betroffene Lokalisation	DIF			Serologie*
				Ort	Datum	BMF	
1	56	M	Mund, Haut	Mund	01.02.13	IgG, C3	IgG: BP180
2	46	W	Mund, Nase	Mund	26.04.10	IgA, C3	IgG: BP180
3	55	W	Mund	Mund Mund	11.09.14 11.09.14	IgG, C3 IgG, C3	negativ
4	46	M	Mund, Nase, Auge	Mund	17.01.08	IgG, C3	IgG: Lam 332
5	53	M	Mund, Auge, Nase, Haut	Mund Haut	19.12.11 19.12.11	C3 IgG, C3	IgG: Lam 332
6	57	M	Mund, Auge, Nase	Mund	01.09.11	IgA	IgA: IIF
7	46	W	Mund	Mund Mund Mund	29.04.15 29.04.15 01.07.15	negativ negativ IgG, IgA	IgG: BP180
8	76	M	Mund	Mund	05.03.10	IgG	IgG: BP180
9	73	M	Mund, Nase	Mund	03.02.11	IgG, C3	IgG: BP180
10	76	W	Mund	Mund Mund	16.07.15 11.09.15	negativ IgG	IgG: BP180
11	79	W	Mund, Genital, Haut	Mund Mund	15.12.09 15.12.09	IgG IgG	IgG: BP180
12	34	W	Mund, Nase, Genital, Haut	Mund Mund Genital Haut	05.10.12 19.10.12 19.10.12 19.10.12	negativ negativ negativ IgG	IgA: BP180 IgG: BP230
13	62	M	Mund, Auge	Mund	01.08.14	IgG, C3	IgG: BP180
14	65	W	Mund	Mund Mund	11.06.15 15.06.15	negativ IgG, IgA, C3	IgG: BP180
15	57	M	Mund, Haut	Mund Haut	28.01.11 28.01.11	IgG, C3 negativ	IgG: BP180
16	68	M	Mund, Nase, Haut	Mund Haut	30.03.11 30.03.11	IgG, C3 C3	IgG: Lam 332, BP180
17	57	M	Auge	Mund	27.05.14	IgG, IgA	IgG: BP180
18	75	W	Mund	Mund	22.07.11	IgG, C3	IgG: BP180
19	90	W	Mund, Haut	Mund	12.01.09	IgG, C3	IgG: BP180
20	23	W	Mund, Auge	Mund	09.08.11	IgA	IgG: BP180
21	83	W	Mund, Auge	Mund Haut Mund Auge	17.07.14 17.07.14 29.07.14 29.07.14	negativ negativ IgA IgA	IgA: BP180
22	40	W	Mund, Nase, Haut	Mund	30.07.14	C3	IgG: BP180
23	74	W	Mund	Mund	10.05.13	IgG, IgA, C3	IgG: BP180

Nr.	Alter	Geschlecht	betroffene Lokalisation	DIF			Serologie*
				Ort	Datum	BMF	
24	62	W	Auge, Haut	Mund Haut	04.09.13 04.09.13	IgG IgG	negativ
25	73	M	Mund, Auge, Pharynx, Ösophagus, Nase	Mund	06.07.10	IgA	IgA: BP180
26	79	M	Mund, Haut	Mund Haut	15.02.13 15.02.13	IgG, C3 IgG, C3	IgG: BP180
27	75	W	Mund	Mund Mund Mund	21.03.12 14.02.14 14.02.14	negativ negativ IgG, IgA	IgA: BP180
28	60	M	Mund, Genital, Haut	Haut	26.01.09	IgG	IgG: BP180
29	79	W	Mund, Haut	Mund Haut	16.10.08 16.10.08	IgG, IgA, C3 IgG, IgA, C3	IgG: BP180
30	46	W	Mund	Mund	26.10.12	C3	IgG: BP180
31	67	W	Mund	Mund Mund Mund	20.05.15 02.12.15 02.12.15	negativ IgG negativ	IgG: BP180
32	59	W	Mund, Genital	Mund Genital	18.03.13 18.03.13	IgG, IgA negativ	IgG, IgA: BP180
33	75	M	Mund, Auge, Haut	Haut	16.06.09	IgG, C3	IgG: Lam 332
34	74	M	Mund	Mund	13.01.09	IgG, IgA	IgG, IgA: IIF
35	50	W	Auge	Auge	23.07.15	negativ	IgG: BP180
36	65	M	Mund, Pharynx, Haut	Haut	08.09.14	C3	IgG: BP180
37	80	M	Mund, Auge, Genital	Mund Mund Auge Auge	24.04.15 24.04.15 30.04.15 30.04.15	negativ IgA negativ negativ	IgA: BP180
38	69	W	Mund	Mund Mund	10.05.11 10.05.11	IgG, C3 IgG, C3	IgG: BP180
39	75	M	Auge	Mund Mund Auge	31.03.14 31.03.14 16.09.14	negativ negativ IgG	IgG: IIF
40	54	W	Mund, Genital	Mund	27.11.13	IgG, IgA	IgG: BP180
41	31	W	Mund	Mund	27.05.09	IgG, IgA, C3	IgG: BP180
42	93	M	Mund, Auge, Nase	Haut Mund Mund	11.01.13 11.01.13 11.01.13	negativ IgG IgG, IgA	IgG: BP180
43	90	W	Auge	Auge Auge	09.10.09 09.10.09	negativ C3	IgG: BP180
44	77	M	Mund	Mund Haut	17.11.08 17.11.08	IgG, IgA, C3 IgG, IgA, C3	IgG: Lam 332

Nr.	Alter	Geschlecht	betroffene Lokalisation	DIF			Serologie*
				Ort	Datum	BMF	
45	55	W	Mund, Nase	Mund	21.11.13	IgG, C3	IgG: BP180
46	76	M	Mund	Mund Mund Mund Mund	05.10.12 12.10.12 24.10.12 24.10.12	negativ negativ IgA IgG, IgA, C3	IgG: Lam 332
47	55	W	Mund, Nase	Mund	06.02.14	IgG	IgG: BP180
48	40	W	Mund	Mund	09.04.14	IgA, C3	IgG, IgA: IIF
49	72	W	Mund, Haut	Haut Mund Mund	25.07.13 31.07.13 31.07.13	negativ C3 C3	IgG: BP180, BP230
50	65	M	Mund, Auge	Mund Mund	17.09.09 08.10.09	negativ C3	IgG: BP180
51	74	W	Mund, Auge	Mund Mund	27.11.13 27.11.13	negativ IgA	IgA: IIF
52	71	W	Auge	Mund	17.05.06	IgG	negativ
53	76	M	Auge	Auge	20.08.15	IgG, IgA	IgG: Lam 332
54	78	W	Mund	Mund	30.04.08	IgG, IgA, C3	negativ
55	75	M	Auge	Auge Mund	24.01.07 30.01.07	IgG IgG	negativ
56	62	W	Auge	Mund Auge Auge	09.04.15 01.07.15 23.07.15	negativ negativ IgG, IgA, C3	negativ
57	65	M	Mund, Haut	Mund	12.02.14	IgG, C3	IgG: BP180
58	39	W	Mund, Haut	Mund	27.04.06	IgG, C3	IgG, IgA: BP180
59	69	M	Mund, Nase	Mund	18.10.10	IgG, IgA	negativ
60	69	M	Mund, Nase	Mund	22.07.15	negativ	IgG: BP180
61	81	M	Auge	Mund	26.01.12	negativ	IgG: BP180
62	62	W	Mund, Haut	Mund Mund Mund	29.05.13 29.05.13 04.03.14	negativ negativ negativ	IgG: BP180
63	58	W	Mund	Mund Mund	14.08.13 29.08.13	negativ IgG	IgG: Lam 332
64	56	M	Mund, Auge	Mund	30.01.13	IgA, C3	IgA: BP180
65	44	W	Mund, Nase	Mund Mund Haut	10.01.08 10.01.08 10.01.08	IgG, C3 negativ IgG, C3	IgG: Lam 332 IgA: BP180
66	56	W	Mund, Auge, Nase, Larynx	Mund Mund	22.05.15 22.05.15	IgG, C3 IgG, C3	IgG: Lam 332
67	65	M	Mund, Auge, Haut, Genital	Haut	03.04.07	IgG, C3	IgG: Lam 332, p200
68	81	W	Mund	Mund	02.01.13	IgG, C3	IgG: BP180
69	50	M	Mund, Nase, Auge	Mund Mund	31.10.08 31.10.08	negativ IgG, IgA	IgG: IIF
70	54	W	Mund,	Mund	20.08.15	IgG, C3	IgG: BP180

Nr.	Alter	Geschlecht	betroffene Lokalisation	DIF			Serologie*
				Ort	Datum	BMF	
			Genital	Mund	20.08.15	IgG, C3	
71	84	M	Mund	Mund Mund	30.09.15 30.09.15	IgG IgG	negativ
72	67	M	Mund, Auge	Mund Mund	14.09.06 27.09.06	negativ IgG, IgA, C3	IgG, IgA: BP180
73	50	W	Mund	Mund Mund	03.03.10 03.03.10	negativ IgG, IgA, C3	negativ
74	71	W	Auge	Auge Auge	16.01.15 18.03.15	negativ IgA	IgG: BP180
75	40	W	Mund	Mund Mund	10.12.08 10.12.08	IgG, C3 IgG, C3	IgG: BP180
76	45	W	Mund, Nase	Mund	03.11.09	IgA	IgA: IIF
77	64	M	Mund	Mund Mund Mund	16.06.15 02.07.15 02.07.15	negativ negativ IgA	IgA: BP180
78	36	W	Mund, Haut	Haut	24.06.11	IgG, C3	IgG: IIF

* Bei den Patienten, die zirkulierende Antikörper sowohl in der IIF als auch bei den antigenspezifischen Verfahren aufwiesen, wurde in der Tabelle nur letzteres angegeben.

M: männlich, W: weiblich, BMF: Basalmembranfluoreszenz, IIF: indirekte Immunfluoreszenz an durch NaCl gespaltener humaner Haut, Lam 332: Laminin 332.

Tabelle 2: Histopathologische Befunde in den Gewebeproben von Patienten mit Schleimhautpemphigoid, die immunhistochemisch untersucht wurden

Nr.	Lokalisation	Subepidermale Spaltbildung	Fibrose	Ulkus	Eosinophile	Neutrophile	Plasmazellen
1	Mund	-	-	X	-	-	-
	Mund	-	-	-	-	-	-
2	Haut	X	-	-	-	-	-
	Mund	X	-	-	-	-	-
3	Mund	-	-	-	-	-	-
4	Mund	-	-	-	-	-	-
5	Mund	-	-	-	++	++	-
6	Mund	-	-	-	-	-	+
7	Haut	X	-	X	-	-	-
	Larynx	-	-	-	-	-	-
8	Haut	X	-	-	+++	+	-
9	Mund	X	-	-	+++	+	-
	Mund	X	-	-	-	-	-
10	Haut	-	-	X	-	-	-
11	Mund	-	-	-	-	-	-
	Mund	-	-	-	-	-	-
12	Haut	X	X	-	++	-	+
13	Haut	X	-	-	-	-	-
14	Haut	X	-	-	+++	+	-
	Mund	X	-	X	-	-	-
15	Mund	X	-	-	-	-	-
16	Mund	-	-	-	-	-	+++
17	Haut	X	-	-	-	-	-
18	Haut	X	-	-	+	-	-
19	Mund	X	-	-	-	-	-
	Mund	X	-	X	+	-	++
20	Mund	-	-	-	-	-	-
	Mund	-	-	-	-	-	-
21	Haut	-	-	-	-	-	-
22	Mund	-	-	-	-	-	-
23	Haut	X	-	-	+	-	-
24	Mund	-	-	X	-	-	-
	Mund	-	-	X	-	-	-
	Mund	-	-	-	-	-	-
	Mund	-	-	-	-	-	-
25	Auge	-	-	-	-	-	-
26	Mund	-	-	-	+	++	-
27	Haut	X	X	-	+	+	+++
	Mund	-	-	-	-	-	-
28	Haut	-	-	-	-	-	-
29	Mund	X	-	X	-	-	-
	Mund	-	-	-	-	-	-
	Mund	X	-	-	-	-	-
30	Haut	X	-	-	+	+++	-
31	Mund	X	-	-	-	-	-
	Mund	X	-	-	-	+++	-
32	Mund	X	-	-	-	++	-
33	Haut	X	-	X	-	-	-

Insgesamt wurde die Histopathologie an 48 Biopsien von 33 Patienten untersucht. Zusätzlich wiesen alle Biopsien ein sehr geringes bis sehr dichtes lymphohistiocytäres Zellinfiltrat in der oberen Dermis/Submukosa auf. Die Zelldichten der Eosinophilen, Neutrophilen und Plasmazellen wurden semiquantitativ bestimmt (+/++/+++). x nachgewiesen, - nicht nachgewiesen

Tabelle 3: Klinik, Immunpathologie, Serologie und Immunhistochemie von Patienten mit Schleimhautpemphigoid

Nr.	betroffene Lokalisation	IHC			DIF		Serologie**
		Ort	C3d*	C4d*	Ort	BMF	
1	Mund, Nase	Mund Mund	- +	- +	Mund	IgA, C3	IgG: BP180
2	Mund, Auge, Nase, Haut	Haut Mund	++ +	++ ++	Mund Haut	C3 IgG, C3	IgG: Lam 332
3	Mund	Mund	-	-	Mund	IgG	IgG: BP180
4	Mund	Mund	+	+	Mund Mund	- IgG	IgG: BP180
5	Mund, Nase, Genital	Mund	-	-	Mund Haut Genital	- IgG -	IgA: BP180 IgG: BP230
6	Mund	Mund	-	+	Mund Mund	- IgG, IgA, C3	IgG: BP180
7	Mund, Nase, Haut	Haut Larynx	++ -	++ -	Mund Haut	IgG, C3 C3	IgG: Lam 332, BP180
8	Mund, Haut	Haut	+	+	Mund	IgG, C3	IgG: BP180
9	Mund, Auge	Mund Mund	- -	- -	Mund	IgA	IgG: BP180
10	Auge, Haut	Haut	-	-	Mund Haut	IgG IgG	-
11	Mund, Auge, Pharynx, Ösophagus, Nase	Mund Mund	- -	- -	Mund	IgA	IgA: BP180
12	Mund, Haut	Haut	+	++	Mund Haut	IgG, C3 IgG, C3	IgG: BP180
13	Mund, Genital, Haut	Haut	-	+	Haut	IgG	IgG: BP180
14	Mund, Haut	Haut Mund	- -	- -	Mund Haut	IgG, IgA, C3 IgG, IgA, C3	IgG: BP180
15	Mund, Auge, Genital	Mund	+	++	Mund	IgG, C3	IgG, IgA: IIF
16	Mund	Mund	-	-	Mund	IgG	IgG: BP180
17	Mund, Auge, Haut	Haut	+	-	Haut	IgG, C3	IgG: Lam 332
18	Mund, Pharynx, Haut	Haut	+	++	Haut	C3	IgG: BP180
19	Mund	Mund Mund	++ +	++ ++	Mund	IgG, C3	IgG: BP180
20	Auge	Mund Mund	- -	- -	Mund Mund Auge	- - IgG	IgG: IIF
21	Mund	Haut	++	-	Mund Haut	IgG, IgA, C3 IgG, IgA, C3	IgG: Lam 332
22	Mund	Mund	-	-	Mund	IgG, IgA, C3	IgG: Lam 332
23	Mund, Haut	Haut	+	+	Haut Mund Mund	- C3 C3	IgG: BP180, BP230

Nr.	betroffene Lokalisation	IHC			DIF		Serologie**
		Ort	C3d*	C4d*	Ort	BMF	
24	Mund, Auge	Mund Mund Mund Mund	- - - -	- - - -	Mund	C3	IgG: BP180
25	Auge	Auge	-	++	Auge Mund	IgG IgG	-
26	Mund, Nase	Mund	+	++	Mund	-	IgG: BP180
27	Mund, Auge	Haut Mund	- -	- -	Mund	IgA, C3	IgA: BP180
28	Mund, Nase	Haut	-	++	Mund Haut	IgG, C3 IgG, C3	IgG: Lam 332 IgA: BP180
29	Mund, Auge, Nase, Larynx	Mund Mund Mund	+ ++ ++	++ ++ ++	Mund	IgG, C3	IgG: Lam 332
30	Mund, Auge, Haut, Genital	Haut	++	++	Haut	IgG, C3	IgG: Lam 332, p200
31	Mund, Auge	Mund Mund	- +	++ ++	Mund	IgG, IgA, C3	IgG, IgA: BP180
32	Mund, Nase	Mund	-	-	Mund	IgA	IgA: IIF
33	Mund, Haut	Haut	+	+	Haut	IgG, C3	IgG: IIF

BMF: Basalmembranfluoreszenz, DIF: direkte Immunfluoreszenz, IHC: Immunhistochemie, IIF: indirekte Immunfluoreszenz an durch NaCl gespaltener humaner Haut, Lam 332: Laminin 332.

* Lineare Ablagerungen entlang der Basalmembran: - negativ, + positiv, ++ stark positiv.

** Bei den Patienten, die zirkulierende Antikörper sowohl in der IIF als auch bei den antigenspezifischen Verfahren aufwiesen, wurde in der Tabelle nur letzteres angegeben.

9 Veröffentlichungen

Diese Dissertation wurde auszugsweise an folgenden Stellen veröffentlicht:

Shimanovich I, Nitz JM, Zillikens D: Multiple and repeated sampling increases the sensitivity of direct immunofluorescence testing for the diagnosis of mucous membrane pemphigoid. J Am Acad Dermatol 77, 700-705 (2017)

Shimanovich I, Nitz JM, Witte M, Zillikens D, Rose C: Immunohistochemical diagnosis of mucous membrane pemphigoid. J Oral Pathol Med 47, 613-619 (2018)

Diese Arbeit wurde auszugsweise im Rahmen folgender Tagungen präsentiert:

The 75th Annual Meeting of the American Academy of Dermatology, März 2017, Orlando, USA.

49. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, April 2017, Berlin.

26. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Histologie (ADH), Mai 2018, Mannheim.

10 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Zillikens für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Klinik durchführen zu dürfen. Mein größter Dank geht an meinen Doktorvater Priv.-Doz. Dr. Iakov Shimanovich für das Überlassen dieses Themas, die stetige Unterstützung, das Vertrauen in meine Arbeit und das zugewandte Miteinander über die Jahre unserer Zusammenarbeit. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht erhoffen können! Außerdem möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. Christian Rose für die vielen Ratschläge und tolle Zusammenarbeit bedanken. Zudem danke ich seinem Laborteam für die unermüdliche Unterstützung. Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich auf meinem Weg stets eng begleitet und stärkt.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Julia Marie Nitz
Geburtsdatum 21.04.1991
Geburtsort Bad Segeberg



Beruflicher Werdegang

09/2010 - 04/2012 Ausbildung zur Rettungsassistentin beim Rettungsdienst-
Verbund Stormarn GmbH
04/2012 - 10/2012 Tätigkeit als Rettungsassistentin für den Rettungsdienst-
Verbund Stormarn GmbH

Hochschulstudium

2012 - 2019 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
08/2014 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09/2015 Beginn der Dissertation
04/2018 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05/2018 - 04/2019 Praktisches Jahr (Wahlfach: Neurologie)
05/2019 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
ab 01.08.2019 Assistenzärztin Innere Medizin, Schön Klinik Neustadt