

Aus dem
Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED)
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Enno Schmidt

**Multizentrische prospektive Studie zur
multivarianten Diagnostik bullöser Autoimmundermatosen
mithilfe der BIOCHIP™-Technologie**

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

vorgelegt von
Stine Krüger
aus Berlin
Lübeck 2019

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

2. Berichterstatterin/Berichterstatter: Prof. Dr. med. Gabriela Riemekasten

Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.2019

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 04.06.2019

Promotionskommission der Sektion Medizin

*Meinen Eltern
gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Bullöse Autoimmundermatosen – Epidemiologie, Pathophysiologie und Klinik	1
1.1.1	Pemphiguserkrankungen.....	3
1.1.1.1	Pemphigus vulgaris und foliaceus.....	3
1.1.1.2	Paraneoplastischer Pemphigus	5
1.1.1.3	Pemphiguserkrankungen mit Autoreaktivität gegen Desmocollin.....	5
1.1.2	Subepidermale bullöse Autoimmundermatosen.....	6
1.1.2.1	Bullöses Pemphigoid.....	6
1.1.2.2	Schleimhautpemphigoid.....	8
1.1.2.3	Anti-Laminin γ 1/p200 Pemphigoid	9
1.1.2.4	Epidermolysis bullosa acquisita	10
1.1.2.5	Dermatitis herpetiformis	10
1.2	Diagnostik bullöser Autoimmundermatosen	11
1.2.1	Etablierter Diagnostikalgorithmus.....	11
1.2.1.1	Diagnostik über Gewebereaktion	12
1.2.1.2	Zielantigennachweis mittels ELISA und Immunoblot	14
1.2.2	Diagnostik mittels BIOCHIP™-Technologie	15
1.2.2.1	Unspezifische desmosomale Fluoreszenzreaktionen bei indirekter Immunfluoreszenz	16
1.3	Fragestellung und Ziele der Arbeit.....	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Patientenseren.....	18
2.2	Blutspenderseren.....	20
2.3	Analyse mittels der BIOCHIP™-Technologie	21
2.3.1	Herstellung der BIOCHIP™-Mosaike	21
2.3.2	Konjugat und Absorptionspuffer	23
2.3.3	Inkubationsschritte und -schema.....	24

2.3.4	Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie	27
2.4	Analyse positiver Blutspender mittels ELISA.....	31
2.5	Statistik	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Leistungsfähigkeit des großen BIOCHIP™-Mosaiks	33
3.1.1	Ergebnisse der serologischen Diagnostik der Studienserum mittels BIOCHIP™-Technologie	33
3.1.2	Korrelation der Diagnosen des BIOCHIP™-Mosaiks mit der direkten Immunfluoreszenz und der etablierten Mehrschritt-diagnostik ...	36
3.1.3	Ergebnisse der serologischen Diagnostik der Blutspenderserum ..	40
3.2	Auftreten und Verteilung von auf Anti-Desmocollin-Antikörper positiv getesteten Serum	41
3.3	Leistungsfähigkeit des Absorptionspuffers	44
3.3.1	Einfluss des Absorptionspuffers auf unspezifische desmosomale Fluoreszenzreaktionen	44
3.3.2	Einfluss des Absorptionspuffers auf diagnosespezifische Fluoreszenzsignale.....	45
3.4	Ergebnisse zum Einfluss von Inkubation mit IgG ₄ -Konjugaten auf Diagnosestellung und Ablesequalität.....	46
4	Diskussion	51
4.1	Das Potential des 12er-BIOCHIP™-Mosaiks in der Diagnostik seltenerer bullöser Autoimmundermatosen	53
4.2	Das Auftreten von Autoantikörpern gegen Desmocolline in Pemphigus- und Pemphigoidserum	59
4.3	Verbesserung der Auswertungsqualität durch Verwendung von Absorptionspuffer und IgG ₄ -Konjugaten	62
5	Zusammenfassung	67
6	Literaturverzeichnis	69
7	Anhang	86
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	86
7.2	Abbildungen.....	88
7.3	Vollständige Ergebnistabelle	92

7.4 Materialien	127
7.5 Votum der Ethikkommission	131
7.6 Publikationen	132
Danksagung	134
Curriculum vitae.....	135

1 Einleitung

1.1 Bullöse Autoimmundermatosen – Epidemiologie, Pathophysiologie und Klinik

Die bullösen Autoimmundermatosen umfassen eine Gruppe von seltenen, teils schwer verlaufenden Autoimmunerkrankungen, bei denen sich Autoantikörper (überwiegend IgG, seltener auch IgA und IgE) gegen Strukturproteine der Haut und Schleimhäute richten [185]. Autoreaktivität gegen diese Strukturproteine führt zu Kontaktverlust der Zellen und so zur charakteristischen intra- und subepidermalen Blasenbildung [62, 162]. Die Häufigkeit der Autoimmundermatosen variiert stark sowohl zwischen den verschiedenen Erkrankungen als auch geographisch, wobei das bullöse Pemphigoid mit einer Inzidenz zwischen 12 und 66 neuen Patienten pro eine Million Einwohner pro Jahr im europäischen Raum am weitaus häufigsten ist [23, 34, 100, 105, 121, 134].

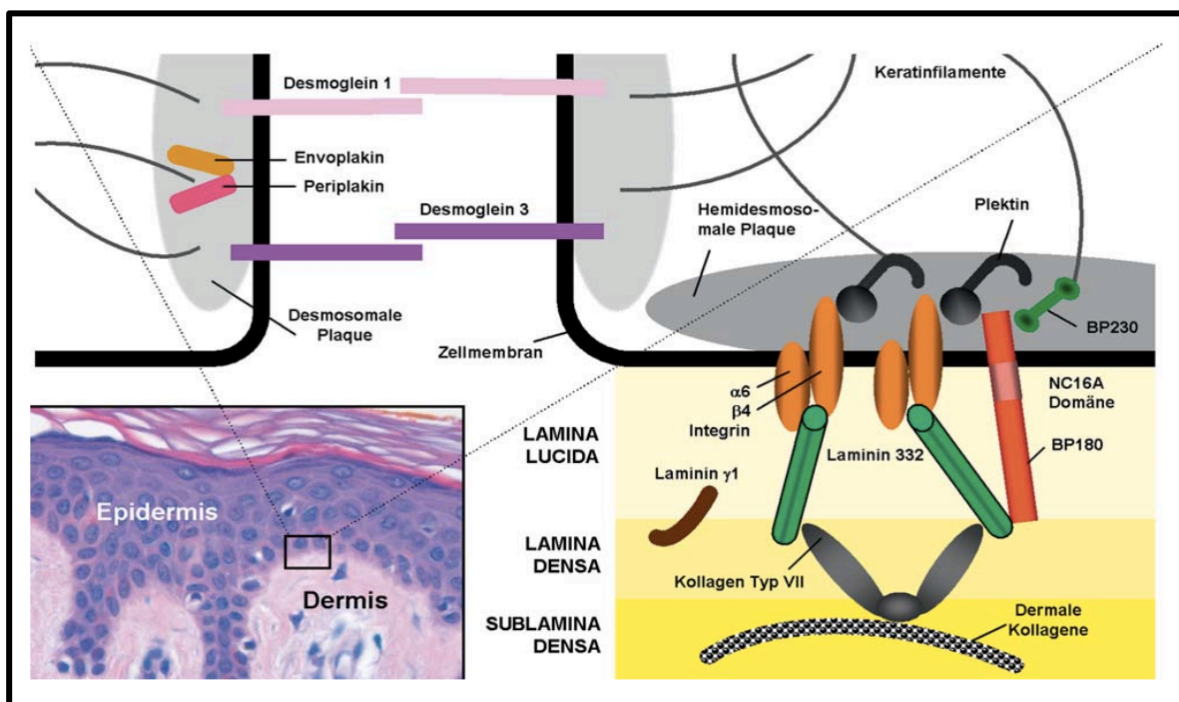


Abb 1.1: Intra- und subepidermale Strukturproteine der Haut

Das histopathologische Bild zeigt einen normalen Hautschnitt mit Epidermis, dermo-epidermaler Junctionszone und Dermis. Die Vergrößerung stellt im oberen Abschnitt schematisch die Proteine des desmosomalen Plaque Envoplakin und Periplakin verbunden durch die Cadherine Desmoglein 1 und 3 dar (nicht dargestellt Desmocollin 1-3). Rechts gezeigt: dreischichtige Basalmembran mit den Haftproteinen BP180, α6β4-Integrin, Laminin 332, Kollagen Typ VII, die den hemidesmosomalen Plaque (über Plektin und BP230) mit dermalen kollagenen Strukturen verbinden. Abbildung entnommen aus Schmidt und Zillikens 2011 [177].

Tab. 1.1 Zielantigene bullöser Autoimmundermatosen*

	Erkrankung	Autoantigen
Intraepidermale Lokalisation der Zielantigene		
Pemphigus-Gruppe	Pemphigus vulgaris (PV)	Dsg3, Dsg1
	Pemphigus foliaceus (PF)	Dsg1
	Paraneoplastischer Pemphigus (PNP)	Envoplakin, Periplakin , Dsg3, Dsg1, BP230, Desmoplakin I und II, α 2-Makroglobulin-like1, Plektin
	IgA-Pemphigus	Dsg3, Dsc1
Subepidermale Lokalisation der Zielantigene		
Pemphigoid-Gruppe	Bullöses Pemphigoid (BP)	BP180 NC16A , BP230
	Pemphigoid gestationis	BP180 NC16A , BP230
	Schleimhautpemphigoid	BP180 NC16A, C-Terminus von BP180, Laminin 332 , BP230, α 6 β 4-Integrin, Kollagen Typ VII, Laminin 311
	Lineare IgA-Dermatose (LAD)	LAD-1 , BP230
	Lichen planus pemphigoides	BP180 NC16A , BP230
	Anti-Laminin γ 1/p200 Pemphigoid	Laminin γ1 (p200 Protein)
	Epidermolysis bullosa acquisita (EBA)	Kollagen Typ VII
Dermatitis herpetiformis (DH)		(epidermale) Gewebstransglutaminase

*Die wichtigen Zielantigene für die jeweilige Erkrankung sind dunkel hervorgehoben. Dsg: Desmoglein; Dsc: Desmocollin. Tabelle zusammengefasst aus Sitaru et al. 2004, Schmidt und Zillikens 2011 und Schmidt und Zillikens 2013 [177, 179, 185].

Die Einteilung erfolgt dabei nach Lokalisation des Antigens in den unterschiedlichen Hautschichten, wobei es sich um desmosomale Strukturproteine der Epidermis (Pemphigus) oder Haftproteine an der dermo-epidermalen Junctionszone (DEJ) (Pemphigoid) handeln kann (siehe Tab. 1.1) [70, 167, 177]. Die Adhäsion der Keratinozyten in der Epidermis wird durch Cadherine wie Desmoglein 1 und 3 (Dsg1,3) und Desmocollin (Dsc1-3) sowie intrazelluläre desmosomale Plaques (Plakoglobin, Plakophilin, Desmoplakin, Envoplakin und Periplakin) aufrechterhalten [205]. Der Kontakt zwischen den basalen Keratinozyten und der Lamina lucida als oberster Schicht der Basalmembran wird durch hemidesmosomale Plaques, bestehend aus Plektin und BP230 in Kontakt mit BP180 (entscheidend in der Pathogenese des bullösen Pemphigoid, siehe

Abschnitt 1.1.2.1) und $\alpha 6\beta 4$ -Integrin, gewährleistet [30]. Laminin 332 und Kollagen Typ VII, welches das Zielantigen bei Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) darstellt, verankern den Komplex mit dermalen Kollagenen (siehe Abb 1.1) [177]. Eine Sonderstellung erhält die Dermatitis herpetiformis, da die (epidermale) Gewebstransglutaminase (Transglutaminase 3) als Zielantigen der Autoreaktivität keine Rolle als Kontaktprotein der Haut inne hat [166].

Im Folgenden sollen einige Autoimmundermatosen sowohl mit intra- als auch subepidermaler Spaltbildung näher betrachtet werden.

1.1.1 Pemphiguserkrankungen

1.1.1.1 Pemphigus vulgaris und foliaceus

Pemphigus vulgaris und foliaceus sind durch das Bild der intraepidermalen Akantholyse geprägt [167]. Die Inzidenz der Erkrankungen liegt in Deutschland und Zentraleuropa vergleichsweise niedrig zwischen 0,6-6,8 neuen Patienten pro eine Million Einwohner pro Jahr [81, 121, 134]. In südlicheren Regionen, wie beispielsweise dem Mittelmeerraum, dem Iran und in der jüdischen Bevölkerung, steigt die Inzidenz, ebenso in deutschen Populationen mit Migrationshintergrund aus süd- und südöstlichen Regionen Europas [14, 34, 81]. Für die Pathogenese entscheidende Zielantigene sind hier die Cadherine Dsg1 (165kDa) und Dsg3 (130kDa), die jeweils gepaart in trans-Stellung Ca^{+} -abhängig die Zell-Zell-Adhäsion der Keratinozyten herstellen [205]. Dass es sich bei den Autoantikörpern gegen diese Zielstrukturen um die für die Pathogenese entscheidenden handelt, zeigen zum einen mehrere Studien zu der Korrelation zwischen Antikörpertiter und Krankheitsaktivität [83, 96, 168], zum anderen neonatale Formen des Pemphigus bei Neugeborenen, die durch den diaplazentaren Transfer der maternalen Autoantikörper in den fetalen Kreislauf zustande kommen [13, 80]. Dabei ist vor allem die N-terminale extrazelluläre Domäne der Desmogleine Ziel der Autoantikörper [5, 36]. Die Spaltbildung wird hier im Gegensatz zu anderen bullösen Autoimmundermatosen wie dem bullösen Pemphigoid weniger durch eine Entzündungsreaktion [82, 187], sondern speziell bei Dsg3 durch Abschirmen und Internalisierung der für die Cadherin-Adhäsion entscheidenden Epitope hervorgerufen [92, 201].

Während sich bei Pemphigus foliaceus die Autoreaktivität ausschließlich gegen Dsg1 richtet [64], ist das dominante Zielantigen bei Pemphigus vulgaris Dsg3, es kann aber zusätzlich auch Autoreaktivität gegen Dsg1 vorhanden sein [6, 65, 88]. Das typische Verteilungsmuster in den unterschiedlichen Hautschichten und die variante Verteilung zwischen Haut und Schleimhäuten ergeben das klassische klinische Bild der beiden Erkrankungen. Gemeinsam sind ihnen schlaaffe Blasen und teils auch Erosionen ohne Blasenbildung durch die vergleichsweise hoch gelegene intraepidermale Spaltbildung der Haut (vor allem bei Pemphigus foliaceus, siehe Abb. 1.2) [132, 177]. Die verhornende Haut enthält in allen Epidermisschichten Dsg1, Dsg3 wird lediglich in den unteren Schichten der Epidermis exprimiert. Die Schleimhäute dagegen enthalten in allen Epithelschichten Dsg3 und nur in den obersten Anteilen findet sich auch Dsg1 [132]. Daher sind Erosionen bei Pemphigus foliaceus ausschließlich auf der verhornenden Haut ohne Schleimhautbeteiligung zu finden [64]. Pemphigus vulgaris dagegen ist primär eine Erkrankung der Schleimhäute (Mukosa-dominant). Bei zusätzlicher Autoreaktivität gegen Dsg1 kommt es zu der mukokutanen Form mit Beteiligung der Haut des Integuments [9, 132].



Abb. 1.2: Klinisches Erscheinungsbild der Pemphiguserkrankungen: A und B zeigen verkrustete Erosionen der verhornenden Haut an Rumpf und Bein von zwei Pemphigus foliaceus Patienten, C rechts eine charakterische erhabene Erosion der Mundschleimhaut eines Patienten mit Pemphigus vulgaris.

1.1.1.2 Paraneoplastischer Pemphigus

Der paraneoplastische Pemphigus ist eine sehr seltene Autoimmunerkrankung, dessen Inzidenz weit unter der des Pemphigus vulgaris und foliaceus liegt [219]. Das schwere klinische Erscheinungsbild des paraneoplastischen Pemphigus wurde erstmals 1990 von Anhalt und Kollegen beschrieben [11]. Neben einer oft ausgeprägten erosiven Stomatitis, von der vor allem der Oropharynx betroffen ist [10], und erythematösen Hautveränderungen mit Erosionen und Blasen [219] spielen für die Klinik und Prognose das gehäufte Auftreten von primär lymphoprolerativen Malignomen (Lymphome, Lymphatische Leukämie, Thymome, im chinesischen Raum auch gehäuft der Morbus Castleman [129]), seltener auch anderen Malignomerkrankungen eine entscheidende Rolle [66, 219]. Die hohe Mortalität von etwa 90% wird allerdings nur zu einem Teil auf die Malignomentstehung zurückgeführt [10]. Eine zusätzliche Beteiligung von anderen Organsystemen wie Gastrointestinaltrakt (Blutungen), Niere und Bronchialsystem (assoziiert mit Bronchiolitis obliterans) sowie septische Geschehen werden häufig als letal beschrieben [10, 146]. Neben der speziellen Klinik unterscheidet die vermutete genetische Prädisposition über das DRB1*03 Allel oder HLA-1 und HLA-2 den paraneoplastischen Pemphigus ebenfalls von anderen Pemphigus-erkrankungen [129, 136]. Für die Pathogenese sind dabei neben IgG-Autoantikörpern gegen Dsg3 und Dsg1 [8, 31] vor allem Autoreaktivität gegen Envoplakin und Periplakin, Plakine des desmosomalen Plaque, nachgewiesen [10, 101]. Autoantikörper scheinen hier eine Retraktion der Keratinozytenfilamente und Akantholyse auszulösen [125]. Der spezifische Nachweis von Antikörpern gegen diese Plakine spielt in der Diagnosestellung eine entscheidende Rolle [153]. Seltener ist auch Autoreaktivität gegen BP230, Desmoplakin I und II, α 2-Makroglobulin-like 1 oder Plektin zu finden [10, 148, 167].

1.1.1.3 Pemphiguserkrankungen mit Autoreaktivität gegen

Desmocollin

Bereits 1984 wurden von Cowin und Kollegen neben der Desmoglein-Familie zwei weitere Cadherine, Desmocollin 1 (Dsc1, 130kDa) und Desmocollin 2 (Dsc2, 115kDa), beschrieben [48]. Die mittlerweile drei Desmocolline Dsc1, Dsc2 und

Desmocollin 3 (Dsc3, 110kDa) interagieren Ca^{+} -abhängig über die extrazelluläre Domäne 1 in trans-Stellung miteinander und, wie gezeigt werden konnte, auch mit Cadherinen der Desmoglein-Familie [43, 47, 109]. Tatsächlich scheint gerade die heterophile Adhäsion zu Desmogleinen entscheidend für den intakten Zellkontakt zu sein [112, 195]. Bei Verlust bzw. der Inaktivierung von Desmocollinen wurden im Mausmodell Störungen der Embryogenese sowie bei Patienten eine arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie beobachtet, was ein für die Entwicklung entscheidendes Vorkommen von Desmocollinen auch außerhalb der Zell-Zell-Interaktionen der Epidermis nahelegt [205]. Die Rolle der Desmocolline (insbesondere Dsc3) in der Zell-Zell-Adhäsion wurde mehrfach beschrieben, da der Verlust von Dsc in Mausmodellen zu Akantholyse und Blasenbildung führte [38, 190]. Vor allem kürzliche Beobachtungen im asiatischen Raum zeigen eine Beteiligung von Desmocollinen als Zielantigen in der Pathogenese der Pemphiguserkrankungen, die teilweise zusammen mit Autoreaktivität gegen Dsg3 beim Pemphigus vulgaris [133, 144, 157], teilweise auch ohne weitere Autoantikörper bei atypischem Pemphigus auftritt [104].

1.1.2 Subepidermale bullöse Autoimmundermatosen

1.1.2.1 Bullöses Pemphigoid

Das bullöse Pemphigoid ist mit einer Inzidenz zwischen 12 und 22 (in England sogar bis zu 66 [121]) neuen Patienten pro eine Million Einwohner pro Jahr die häufigste bullöse Autoimmundermatose [23, 79, 100, 134]. Dabei steigt die Inzidenz stark mit dem Alter, sodass bei über 80-jährigen eine Inzidenz zwischen 150 und 330 neuen Patienten pro eine Million Einwohner pro Jahr beschrieben wird, während sie bei unter 50-jährigen unter 0,5 neuen Patienten pro eine Million Einwohner pro Jahr liegt [23, 79, 102, 121]. Zielantigene des bullösen Pemphigoids sind die beiden hemidesmosomalen Proteine BP180 (180kDa, auch Kollagen Typ XVII oder BPAG2 genannt) [54, 71] und BP230 (230kDa, auch Dystonin oder BPAG1 genannt) [117, 191]. Während die genaue Rolle von BP230 für die Pathophysiologie des bullösen Pemphigoids noch überwiegend unklar ist [179], beschreiben mehrere Tiermodelle die Entzündungsmechanismen der Autoreaktivität gegen das transmembranös gelegene BP180, die zur typischen

Klinik des bullösen Pemphigoids führen [179]. Die Autoantikörper (vornehmlich IgG, häufig aber auch IgA und IgE [44, 60, 113]) richten sich dabei vor allem in frühen Krankheitsstadien gegen die extrazellulär gelegene sechzehnte nicht-kollagene Domäne des BP180 (BP180-NC16A) [71]. Sowohl Fc-Rezeptor-unabhängig über direkte Internalisierung des BP180 in den Keratinozyten [99, 172] als auch Fc-Rezeptor-abhängig kommt es zur massiven Ausschüttung von Interleukinen IL-6 und IL-8, die zur Aktivierung des Komplementsystems führen [68, 130, 186]. Dieses triggert zusammen mit den Chemokinen die Migration und Anreicherung von Mastzellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und T-Lymphozyten in der dermo-epidermalen Junktionszone [26]. Die Degranulation von Proteasen wie Plasmin, α 1-Proteinase und Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) und reaktiven Sauerstoffspezies bestimmt schlussendlich die Spaltung der Proteinkomplexe des hemidesmosomalen Plaque der Keratinozyten und der Basalmembran [127, 131]. Ähnlich wie beim Pemphigus wird auch hier ein Zusammenhang zwischen Krankheitsaktivität und Konzentration der Autoantikörper beobachtet, der die Rolle dieser Antikörper in der Pathogenese des bullösen Pemphigoids untermauert [53, 94, 171].

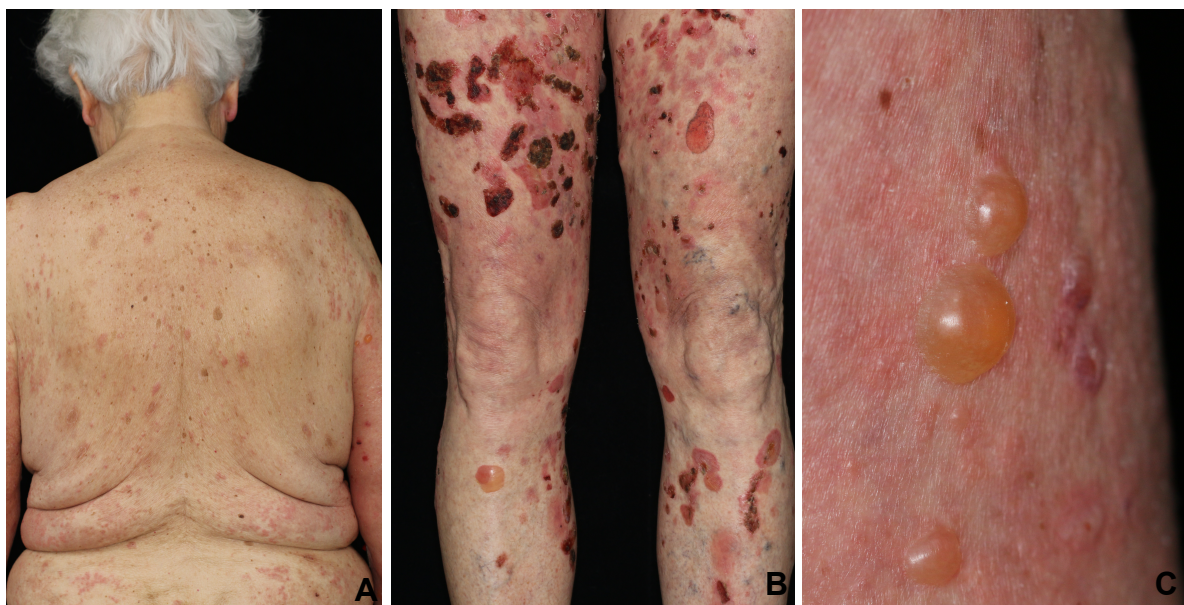


Abb. 1.3: Klinisches Erscheinungsbild des bullösen Pemphigoids: A und B zeigen großflächige Erosionen an Rumpf und Beinen zweier Patienten mit bullösem Pemphigoid. Zusätzlich sind neben Erosionen bei B auch pralle Blasen zu sehen, deren Beschaffenheit bei C vergrößert dargestellt ist.

Das klinische Erscheinungsbild ergibt sich aus der Lokalisation der Spaltbildung subepidermal: Es zeigen sich gespannte, klare Blasen und Erytheme sowie verkrustete Erosionen vornehmlich an Rumpf und den Beugeseiten der Extremitäten (siehe Abb. 1.3) [179]. Eine Schleimhautbeteiligung ist nur selten zu beobachten [174]. Ebenfalls charakteristisch ist ein starker Juckreiz, der den erosiven Hauterscheinungen oft schon Monate vorausgehen kann und auch häufig im Krankheitsverlauf bestehen bleibt [174, 179]. Neben dem Juckreiz ist ein gehäuftes Auftreten von neurologischen Erkrankungen wie Schlaganfälle, Epilepsie, Morbus Parkinson und Multiple Sklerose bei Patienten mit bullösem Pemphigoid beobachtet worden [16, 42, 119, 120, 196]. Erklärt werden kann dies durch zusätzliches Auftreten der Zielantigene BP180 und BP230 in Nervenzellen, welche bei Verlust durch Autoreaktivität zu genannten Pathologien führen [46, 116, 118, 181]. Vermutete Assoziationen des bullösen Pemphigoids zu anderen bullösen Autoimmundermatosen oder verschiedenen Krebserkrankungen konnten bisher nicht bestätigt werden [128, 199].

1.1.2.2 Schleimhautpemphigoid

Das Schleimhautpemphigoid ist seit 2002 definiert als eine bullöse Autoimmundermatose mit Autoantikörpern gegen Strukturen der dermo-epidermalen Junktionszone und überwiegend Schleimhautbefall [35]. Dabei finden sich oft symmetrische, narbig abheilende Läsionen vor allem an der Mundschleimhaut in ca. 85 Prozent der Fälle und den Konjunktiven (65%), ein Befall in weiteren Bereichen der Kopf- und Halsregion wie an der Nase, im Pharynx oder Ösophagus, aber auch der Anogenitalregion und Bereichen der verhornenden Haut am Integument sind möglich [35, 179, 188, 200]. Ähnlich dem bullösen Pemphigoid erkranken Betroffene meist im höheren Alter mit einem mittleren Erkrankungsbeginn von 60 bis 65 Jahren [3, 179, 200]. Die über die letzten Jahre steigende Inzidenz zeigte sich in Deutschland und Frankreich mit 0,9 bis 2 Fällen pro eine Million Einwohner pro Jahr [22, 23, 218]. Der überwiegende Anteil (ca. 75%) der Autoantikörper richtet sich beim Schleimhautpemphigoid gegen BP180, wobei hier im Vergleich zum bullösen Pemphigoid nur etwa die Hälfte der Antikörper die NC16A-Domäne targetiert und sich die Autoreaktivität vor allem gegen den C-Terminus der extrazellulären Domäne richtet [15, 150, 173,

179]. Weitere Zielantigene des Schleimhautpemphigoids sind BP230, $\alpha 6\beta 4$ -Integrin, Kollagen Typ VII und Laminin 332, welches als Heterotrimer aus den Ketten $\alpha 3$, $\beta 3$ und $\gamma 2$ besteht [12, 21, 58, 59, 75, 158]. Der Nachweis von Autoantikörpern gegen Laminin 332 bei Schleimhautpemphigoid ist mit einem vermehrten Auftreten von malignen Tumoren der Haut, Adnexen und Augen assoziiert und hat daher einen besonderen diagnostischen Stellenwert [61, 74, 124, 137]. Die Diagnostik erfolgte hier bisher vor allem über spezifische ELISA-Testsysteme und Immunoblots [19, 122]. Neue Studien von Goletz und Kollegen konnten zudem die Möglichkeit einer IIF-Diagnostik mittels Laminin 332 exprimierenden HEK293 Zellen zeigen [74].

1.1.2.3 Anti-Laminin $\gamma 1/p200$ Pemphigoid

Von 1996 bis 2015 wurde über etwa 70 Fälle von Anti-Laminin $\gamma 1/p200$ Pemphigoid berichtet, einer seltenen bullösen Autoimmundermatose, dessen Zielantigene sich ebenfalls in der dermo-epidermalen Junktionszone befinden [73, 138, 179]. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei diesen Fällen bei 72 Jahren [73]. Durch das dem bullösen Pemphigoid ähnliche klinische Erscheinungsbild (pralle Blasen und Erosionen, oft von starkem Juckreiz geprägt, teils mit Schleimhautbeteiligung [56, 73, 98, 141]) und das Fehlen von rekombinanten Zielantigenen in der Diagnostik wurde die Erkrankung jedoch häufig als bullöses Pemphigoid oder entzündliche Variante einer Epidermolysis bullosa acquisita fehldiagnostiziert [73, 138, 179]. Zielantigen ist ein 200kD Protein der oberen Dermis, das im Immunoblot mit Extrakt aus humaner Dermis nachgewiesen werden kann [215]. In 90 Prozent der Fälle von Anti-Laminin $\gamma 1/p200$ Pemphigoid konnte Autoreaktivität gegen den C-Terminus von Laminin $\gamma 1$ gezeigt werden, welches als rekombinantes Zielantigen in der spezifischen Diagnostik mittels ELISA Verwendung findet [50, 56, 78, 215]. Verschiedene Kryoschnitt- und Mausmodelle zeigten für die Pathophysiologie von Anti-Laminin $\gamma 1/p200$ Pemphigoid jedoch eine untergeordnete Rolle von Antikörpern gegen Laminin $\gamma 1$ [73, 110, 202]. So zeigte sich sowohl in als auch ex vivo in Versuchen mit Injektion von reinen Anti-Laminin $\gamma 1$ -Antikörpern keine Blasenbildung, während in Kryoschnitten durch injizierte Seren von Patienten mit Anti-Laminin $\gamma 1/p200$ Pemphigoid sowohl mit als auch ohne Depletion von Anti-Laminin $\gamma 1$ -Antikörpern

eine Blasenbildung induziert werden konnte [73, 110, 202]. Ganz überwiegend gehören die Antikörper gegen das in der Lamina rara externa gelegene p200 Protein der IgG₄ Subklasse an [39, 215]. Zudem finden sich in ca. einem Viertel der Fälle zusätzlich Antikörper gegen weitere Zielantigene wie BP180, BP230, Kollagen Typ VII und Laminin 332 [73, 143, 208, 209]. Eine Assoziation von Anti-Laminin γ 1/p200 Pemphigoid mit Psoriasis wurde vor allem bei japanischen Patienten beschrieben [39, 50, 103].

1.1.2.4 Epidermolysis bullosa acquisita

Die Epidermolysis bullosa acquisita gehört mit einer Inzidenz zwischen 0,2 und 0,5 neuen Patienten pro eine Million Einwohner pro Jahr zu den seltenen subepidermal blasenbildenden Autoimmundermatosen [22, 23, 206]. Antikörper sind hier gegen die N-terminale NC1-Domäne des Ankerproteins Kollagen Typ VII gerichtet, welches in der Lamina densa und Sublamina der Basalmembran zu finden ist [41, 207]. Zur Spaltbildung führt vornehmlich die Fc-Rezeptor-abhängige Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, nachdem die Bindung von Autoantikörpern und Glykolysierung des Kollagen Typ VII stattgefunden hat [183]. Das klinische Erscheinungsbild der Epidermolysis bullosa acquisita ist heterogen [41, 159]. Die klassische Form zeigt ähnlich dem bullösen Pemphigoid prall gespannte Blasen, die sich bei der mechanobullösen Form der Epidermolysis bullosa acquisita überwiegend an mechanisch beanspruchten Stellen der Extremitätenstreckseiten befinden [155, 179]. Die Erosionen verheilen narbig mit Hyper- oder Hypopigmentierung und Milien [179]. Es wurden zudem der Verlust von Nägeln bei Beteiligung der Finger sowie narbige Stenosen im Bereich des Ösophagus beschrieben [159]. Die entzündliche Form kann dem bullösen Pemphigoid oder Schleimhautpemphigoid ähneln und verläuft in etwa 50 Prozent mit Schleimhautbeteiligung [33].

1.1.2.5 Dermatitis herpetiformis

Wie eingangs erwähnt erhält die Dermatitis herpetiformis (auch nach dem Erstbeschreiber 1884 Morbus Duhring genannt [213]) in der Gruppe der bullösen Autoimmundermatosen eine Sonderstellung, da das Zielantigen kein Strukturprotein der dermo-epidermalen Junktionszone ist und die typische

Spaltbildung tiefer gelegen in der papillären Dermis stattfindet [179]. Vielmehr stellt die Dermatitis herpetiformis eine kutane Form der Zöliakie dar, bei der IgA-Antikörper gegen desamidierte Gliadinfragmente aus Gluten und Gewebstransglutaminase [55, 76] (TG2, erstmals beschrieben als Endomysiumantikörper in der glatten Muskulatur [115]) durch Zerstörung der Darmmukosa zu Malassimilation und Fettstühlen führt [213]. Anders herum sind aber bei nicht jedem Patienten mit Zöliakie Hautveränderungen im Sinne einer Dermatitis herpetiformis zu beobachten [192]. Der Zusammenhang zwischen Zöliakie und Dermatitis herpetiformis wird durch die bei beiden Erkrankungen nachgewiesenen genetischen Merkmale HLA DQ2 und HLA DQ8 untermauert [29]. Neben der Gewebstransglutaminase wurde 2002 von Sárdy und Kollegen die epidermale Transglutaminase (TG3) als entscheidendes Zielantigen bei Dermatitis herpetiformis beschrieben, wobei die zur Blasenbildung führende Pathophysiologie bisher weitgehend ungeklärt ist [166]. Das Erkrankungsalter liegt meist zwischen der zweiten und vierten Lebensdekade, hohe Prävalenzen wurden vor allem in Skandinavien, Irland und Schottland beschrieben [45] (in Schottland und Schweden 110 und 229 pro eine Million [69, 142]). Die Klinik dominiert durch starken Juckreiz und symmetrisch verteilte papulovesikuläre, erythematöse Plaques an Extremitätenstreckseiten, Schultern, behaarter Kopfhaut, Sakralregion und Gesäß ohne Schleimhautbeteiligung [213]. Die gastrointestinalen Beschwerden der Zöliakie sind bei Patienten mit Dermatitis herpetiformis oft nur schwach ausgeprägt [91, 213].

1.2 Diagnostik bullöser Autoimmundermatosen

1.2.1 Etablierter Diagnostikalgorithmus

In Deutschland hat sich als Standard zur Diagnostik bullöser Autoimmundermatosen ein Mehrschrittverfahren etabliert [169]. Über histopathologische Veränderungen und Fluoreszenzreaktionen des Patientengewebes und die indirekte Immunfluoreszenz kann mit gezieltem Verdacht auf bestimmte Antikörper mittels ELISA und Western Blot getestet und so die Diagnose gestellt werden [169, 177, 178].

1.2.1.1 Diagnostik über Gewebereaktion

Bei der histopathologischen Untersuchung wird eine läsionale Gewebebiopsie wenn möglich einer kleinen vollständigen Blase oder partiell einer Blase mit Übergang in gesundes Gewebe entnommen und unter z.B. Hämatoxilin/Eosin-Färbung mikroskopisch untersucht [169]. Beurteilbar sind die Lokalisation der Spaltbildung im Stratum granulare der Epidermis (Pemphigus foliaceus), suprabasal (Pemphigus vulgaris) oder subepidermal (Pemphigoiderkrankungen und Dermatitis herpetiformis) und die Zusammensetzung des Entzündungsinfiltrats, die jedoch nicht die Differenzierung der unterschiedlichen Pemphigoiderkrankungen und Dermatitis herpetiformis erlaubt (siehe Abb. 1.4) [139, 185].

Der Goldstandard in der Diagnostik der bullösen Autoimmundermatosen ist die direkte Immunfluoreszenz (DIF) [177]. Hier sollte periläsionales Gewebe biopsiert werden, da Antikörper im Bereich der Blasen oft bereits durch den Entzündungsprozess abgebaut wurden oder unspezifisch binden [177]. Die gewebegebundenen Autoantikörper werden durch mit Fluorescein markierte Anti-human-IgA/IgG- und Anti-C3-Antikörper fluoreszenzmikroskopisch dargestellt [162]. Dabei können Pemphiguserkrankungen durch eine charakteristische epitheliale, interzelluläre Ablagerung von subepidermal blasenbildenden Autoimmundermatosen unterschieden werden, deren lineares Signal im Bereich der Basalmembran typisch für die Antikörperablagerung an der dermo-epidermalen Junktionszone ist (siehe Abb. 1.4) [185, 204]. Auch die Darstellung von papillär gelegenen IgA-Antikörpern, die für die Dermatitis herpetiformis charakteristisch sind, ist möglich [204].

Zur weiteren Differenzierung vor allem der subepidermal blasenbildenden Autoimmundermatosen wird das serologische Testverfahren der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) eingesetzt [177, 185]. Durch Inkubation von mit 1M NaCl-Lösung in der dermo-epidermalen Junktionszone gespaltenen humanen Haut mit Patientenserum binden die Autoantikörper spezifisch an Blasendach oder –boden und können anschließend durch Fluorescein-markierte Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden (siehe Abb. 1.4) [106]. Bindung am Blasendach ist charakteristisch für Antikörper gegen BP180 und BP230, Bindung an Blasenbodenstrukturen unter anderem für Antikörper gegen Kollagen Typ VII,

Laminin 332 oder Laminin $\gamma 1/p200$ Protein [175, 179]. Dies ermöglicht weitere Rückschlüsse auf die genaue Erkrankung. Für die Diagnostik von Pemphigus-Erkrankungen wird Affenösoophagus verwendet [177]. Ähnlich der DIF ist auch hier eine netzförmige, interzelluläre Fluoreszenz im Epithel wegweisend [185, 205]. Durch einen hohen Plakin-Anteil im Urothel wird die Ratten- oder Affenblase zur Diagnostik bei Verdacht auf paraneoplastischen Pemphigus genutzt [176]. Die Dermatitis herpetiformis kann bei der IIF durch IgA-Reaktionen am Endomysium der zirkulären Muskulatur des Affenösoophagus festgestellt werden [175].

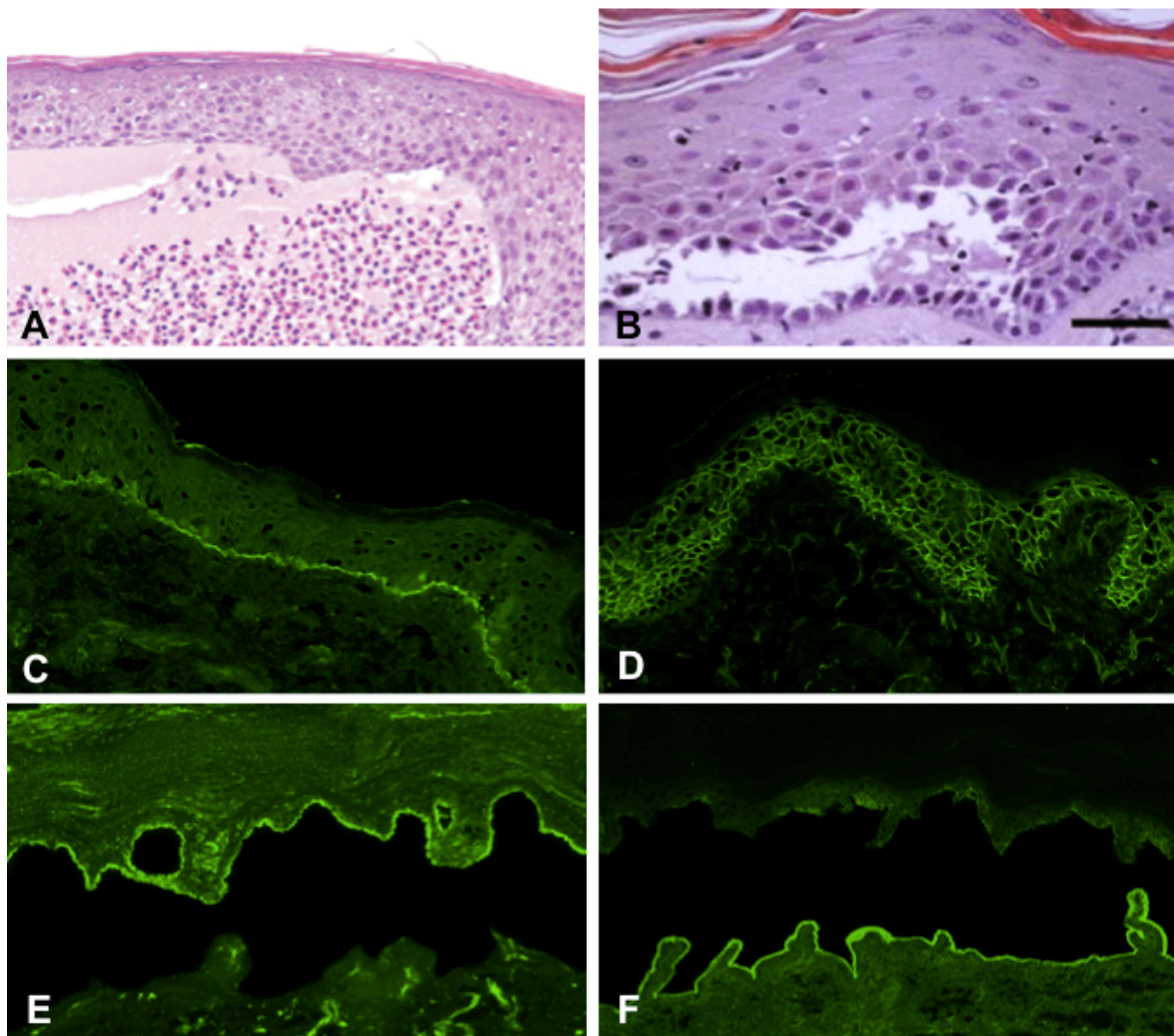


Abb. 1.4: Histopathologie (A, B), DIF (C, D) und IIF (E, F) bei Pemphigoiderkrankungen und Pemphigus: A zeigt die charakteristische Ansammlung von eosinophilen Granulozyten in der subepidermalen Blase bei bullösem Pemphigoid, B die subbasale Spaltbildung bei Pemphigus vulgaris. Die lineare Fluoreszenz der DIF im Bereich der dermo-epidermalen Junctionszone weist auf eine Pemphigoiderkrankung hin (C), während das interzelluläre Muster für Pemphiguserkrankungen typisch ist (D). IIF: Fluoreszenz am Blasendach (E) zeigt sich primär bei Autoantikörpern gegen BP180 und BP230. Antikörper gegen Laminin 332, Laminin $\gamma 1/p200$ Protein oder Kollagen Typ VII binden am Blasenboden (F). A entnommen aus Schmidt und Zillikens 2013 [179], B entnommen aus Bieber et al. 2010 [26], E und F freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Tarek Fuhrmann.

1.2.1.2 Zielantigennachweis mittels ELISA und Immunoblot

Für einige der bullösen Autoimmundermatosen existieren kommerzielle antigenspezifische *Enzyme-linked Immunosorbant Assays* (ELISA) (siehe Tabelle 1.1) [177], z.B. für die sensitive und spezifische Diagnostik von Anti-Dsg3- und Anti-Dsg1-Antikörpern bei Pemphigus vulgaris und foliaceus sowie für paraneoplastischen Pemphigus spezifische Anti-Envoplakin-Antikörper [7, 96, 153, 168]. Dabei werden Antigen-Antikörper-Bindungen durch enzymatisch getriggerte Farbreaktionen dargestellt, die durch wellenlängenspezifische Extinktionsmessungen quantifiziert werden können [63, 203]. Antikörper gegen Envoplakin und Periplakin können zudem im Immunoblot mit Antigenextrakten aus kultivierten humanen Keratinozyten detektiert werden [145, 153, 212].

Auch für das bullöse Pemphigoid steht eine ELISA-basierte Diagnostik sowohl spezifisch für die 16. nicht-kollagene Domäne des BP180 (BP180-NC16A) als auch BP230 zur Verfügung, wobei die IgG-Antikörper gegen BP180 mit einem Auftreten von 80 bis 90% (bei BP230 60-70%) dominant sind [28, 114, 170, 184, 210, 216]. Der Anti-BP230-Antikörper-Titer zeigt im Gegensatz zu den Serumantikörpern gegen BP180 keine Korrelation mit der Krankheitsaktivität, was die untergeordnete Rolle der Antikörper gegen BP230 in der Pathophysiologie des bullösen Pemphigoids untermauert [114]. Sowohl bei Pemphigus vulgaris und foliaceus als auch beim bullösen Pemphigoid findet sich neben zusätzlichen IgA- und IgE-Antikörpern eine Prädominanz der IgG₄-Subklasse [25, 60, 67, 113, 189]. Weitere subepidermal blasenbildende Autoimmundermatosen wie das Schleimhautpemphigoid oder Anti-Laminin γ 1/p200 Pemphigoid können über Antikörperdetektion gegen BP180 und Laminin 332 bzw. Laminin γ 1/p200 Protein im Immunoblot und bei Laminin γ 1/p200 Protein auch im ELISA nachgewiesen werden [73, 177]. Anti-Kollagen Typ VII-Antikörper bei der Epidermolysis bullosa acquisita werden sowohl im Immunoblot als auch in kommerziellen ELISA dargestellt [40, 111, 176]. Auch für den Nachweis von IgA-Antikörpern gegen epidermale und Gewebstransglutaminase in der Diagnostik der Dermatitis herpetiformis existieren sensitive, kommerzielle ELISA-Testsysteme [161].

Verlaufskontrollen der Krankheitsaktivität mittels ELISA unter Therapie und zur Therapieeinstellung bieten sich bei Patienten mit Pemphigus vulgaris, Pemphigus foliaceus und bullösem Pemphigoid an, da die Antikörperspiegel im Serum gegen

die entsprechenden Zielantigene Dsg3, Dsg1 und BP180-NC16A mit der Krankheitsaktivität der Patienten korrelieren [83, 168, 171].

1.2.2 Diagnostik mittels BIOCHIP™-Technologie

Neben dem beschriebenen Mehrschrittverfahren besteht seit kurzem die Möglichkeit, bullöse Autoimmundermatosen über kommerzielle BIOCHIP™-Mosaik (EUROIMMUN AG, Lübeck) zu diagnostizieren [154, 193]. Die Diagnostik geschieht mittels indirekter Immunfluoreszenz mit dem Unterschied, dass sowohl die klassischen Gewebereaktionen als auch spezielle Zielantigene zu einem Zeitpunkt als Einschrittmethode durch Fluoreszenzmikroskopie dargestellt und ausgewertet werden können [154, 194]. 2012 zeigten van Beek und Kollegen die hohe Sensitivität und Spezifität dieser Diagnostik von Pemphigus vulgaris, Pemphigus foliaceus und bullösem Pemphigoid mit einem aus sechs Chips bestehenden Mosaik (siehe Abb. 1.5) [17].

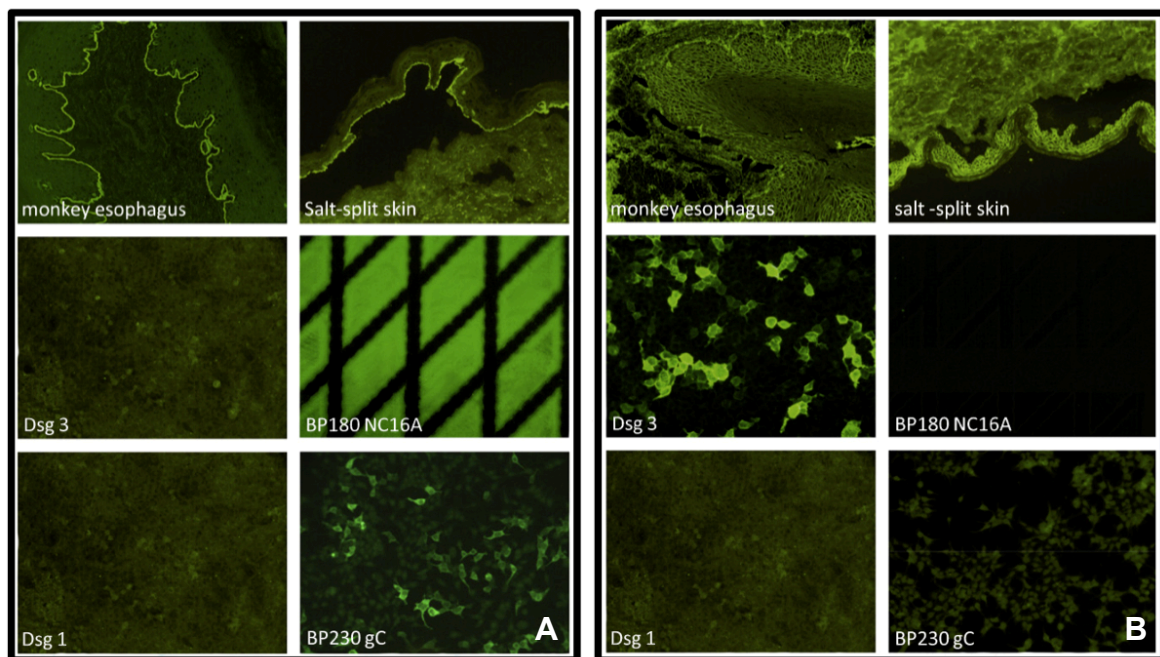


Abb. 1.5: Mosaik der EUROIMMUN AG mit sechs BIOCHIPS™. Abbildung A zeigt ein Mosaik inkubiert mit Serum eines Patienten mit bullösem Pemphigoid. Positive Gewebereaktionen finden sich linear im Bereich der Basalmembran des Affenösophagus sowie am Blasendach der mit 1M NaCl-Lösung gespaltenen Haut. Als Zielantigen reagiert sowohl das rekombinant hergestellte BP180NC16A-4X als auch BP230gC exprimierende HEK293 Zellen. Bei B dargestellt: ein mit Serum eines Patienten mit Pemphigus vulgaris inkubiertes BIOCHIP™-Mosaik. Auf Affenösophagus und Spalthaut zeigt sich interzelluläre epidermale Fluoreszenz. Zusätzlich reagieren die Dsg3 exprimierenden HEK293 Zellen. Abbildungen entnommen aus van Beek et al. 2012 [17].

Die Gewebeschnitte bestehen ähnlich wie bei der herkömmlichen IIF aus Affenösophagus und mit 1M NaCl-Lösung gespaltener Haut [17, 177]. Die Zielantigene waren zum einen rekombinant hergestelltes tetrameres BP180-NC16A-4X (bullöses Pemphigoid), zum anderen BP230-gC (C-terminale globuläre Domäne des BP230, bullöses Pemphigoid), Dsg1 und Dsg3 (Pemphigus) exprimierende humane HEK293 Zellen [17]. In einer Kohorte von 454 randomisierten Seren von Patienten mit bullösen Autoimmundermatosen, anderen blasenbildenden Hauterkrankungen und gesunden Blutspendern wurden im Vergleich das Mosaik-System und das Routinemehrschrittverfahren angewandt und Cohens Kappa Werte zwischen 0,88 und 0,97 erreicht [17]. Auch in weiteren kleineren Studien wurde das Potential zum Screening auf Autoantikörper bei bullösen Autoimmundermatosen ähnlich den ELISA-Testsystemen bei Pemphigus vulgaris und bullösem Pemphigoid beschrieben [51, 164, 197, 211]. Der Nutzen des Mosaiks zum Darstellen von Autoantikörperspiegeln zur Beurteilung der Krankheitsaktivität der Patienten war allerdings der Verwendung entsprechender ELISA-Systeme unterlegen [17].

1.2.2.1 Unspezifische desmosomale Fluoreszenzreaktionen bei indirekter Immunfluoreszenz

Neben Autoantikörpern gegen desmosomale Strukturproteine wie Dsg1 und Dsg3 bei Pemphiguserkrankungen wurde mehrfach gezeigt, dass auch Antikörper gegen die Blutgruppenantigene A und B sehr ähnliche charakteristische epidermale interzelluläre Fluoreszenzmuster hervorrufen können [72, 123, 126]. Dies scheint durch Strukturähnlichkeit der desmosomalen Epitope mit denen der Blutgruppenantigene und dadurch bedingte unspezifische Bindungen auf den Gewebeschnitten hervorgerufen zu werden [123]. Diese unspezifischen desmosomalen Gewebereaktionen bei der IIF-Diagnostik von Antikörpern gegen Haut und Schleimhäute führen vermehrt zu falsch positiven Ergebnissen und verringern so die Spezifität des Testsystems [72, 123].

1.3 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Durch eine systematische Untersuchung der bisher weltweit größten Kohorte von Seren von Patienten mit bullösen Autoimmundermatosen mit der BIOCHIP™-Technologie, die parallel auch durch das Routinemehrschrittverfahren charakterisiert wird (Daten zum Routinemehrschrittverfahren wurden in der Arbeit von Tarek Fuhrmann erhoben), sollen folgende Fragestellungen näher betrachtet und als Ziele dieser Arbeit definiert werden:

1. Vergleich der Leistungsfähigkeit eines größeren BIOCHIP™-Mosaiks (12 Chips) zur Diagnostik von auch selteneren Autoimmundermatosen wie der Epidermolysis bullosa acquisita oder Dermatitis herpetiformis in der Einschrittmethode mit der des oben beschriebenen Routinemehrschrittverfahrens. Die Etablierung des BIOCHIP™-Mosaiks könnte eine schnellere und simple Diagnostikmethode für bullöse Autoimmunerkrankungen darstellen.
2. Analyse des Auftretens und der Assoziation von Autoantikörpern gegen Desmocolline mit verschiedenen bullösen Autoimmundermatosen durch Screening aller Seren mit einem neuen Desmocollin-Mosaik.
3. Prüfung des möglichen Vorteils eines Absorptionspuffers zur Eliminierung von unspezifischen desmosomalen Fluoreszenzreaktionen in der IIF durch zusätzliche Inkubation einer ausgewählten Kohorte mit genannten unspezifischen Reaktionen mit dem Absorptionspuffer.
4. Analyse und systematischer Vergleich der Ablesequalität bei Inkubationen mit herkömmlichen IgG-Konjugaten und bei IIF-Schnitten, die mit speziell gegen IgG₄ gerichteten Sekundärantikörpern im Konjugat inkubiert wurden. Höhere Signalstärken könnten zur Vereinfachung der Auswertung von Fluoreszenzmikroskopien und eindeutigeren Ergebnissen führen.

2 Material und Methoden

Sofern nicht anders im Text vermerkt, wurden alle hier beschriebenen Arbeiten mit den Seren ab ihrem Eintreffen im Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie von mir persönlich durchgeführt.

2.1 Patientenseren

749 Patientenseren wurden in einem Zeitraum von dreieinhalb Jahren von Juni 2012 bis Dezember 2015 an 12 internationalen Zentren sowie der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, gesammelt (siehe Tab. 2.1). Die Rekrutierung der Seren geschah im Rahmen der *Multicentre prospective study on serum antibodies against target antigens of bullous autoimmune diseases and genetic susceptibility*, deren Ziel die Validierung der BIOCHIP™-Mosaik sowie die Erstellung einer DNA Kohorte gut charakterisierter Patienten mit bullösen Autoimmundermatosen war. Entscheidendes Kriterium für den Einschluss von Patientenmaterial in die Studie war ein positives Ergebnis in der DIF, kompatibel mit einer bullösen Autoimmundermatose. Von den Zentren angegebene Diagnosen zu den Seren waren: Pemphigus vulgaris, Pemphigus foliaceus, bullöses Pemphigoid, Schleimhautpemphigoid, Dermatitis herpetiformis, Epidermolysis bullosa acquisita, paraneoplastischer Pemphigus, lineare IgA-Dermatose, Pemphigoid gestationis, Lichen planus pemphigoides, Anti-Laminin γ 1/p200 Pemphigoid, Pemphigus erythematosus, Pemphigus vegetans und vernarbendes Pemphigoid Typ Brunsting-Perry. Seren mit Angaben entsprechender Klinik einer blasenbildenden Autoimmundermatose, jedoch einem negativen Ergebnis in der DIF wurden ausgeschlossen.

Die Nutzung der Seren für die Studie unterlag der Aufsicht der für das jeweilige Zentrum zuständigen Ethikkommission (siehe Votum der Ethikkommission, Anhang Abschnitt 7.5) sowie der schriftlichen Einwilligung des Patienten und folgt den Leitlinien für Good Clinical Practice und der Deklaration von Helsinki.

Die in den Zentren entnommene Blutprobe wurde vor Ort zentrifugiert, das Serum abpipettiert und in zwei 250µl umfassende Portionen aliquotiert und anschließend bis zum Transport bei -80°C gelagert. Der Transport nach Lübeck erfolgte auf Trockeneis. Neben den Seren wurden die ausgefüllten Case Report Forms von den Zentren mitgeschickt, die durch eine eindeutige Identifikationsnummer dem jeweiligen Serum zugeordnet wurden. Neben den Angaben zu Alter und Geschlecht waren weitere Angaben wie das Datum der Blutentnahme, die Ergebnisse der DIF, die Klinik des Patienten sowie die genaue Diagnose enthalten (siehe Anhang Abb. 7.1 und 7.2). Eine Exceltabelle dieser Daten war im Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED) der Universität zu Lübeck bereits erstellt worden.

Tab. 2.1 Beteiligte Zentren und Verteilung der Patientenproben

Land (Stadt)	Kontaktperson	n = Anzahl Patientenseren
Bulgarien (Sofia)	Kossara Drenovska	138
Australien (Sydney)	Dedee Murrell	15
Israel (Tel Aviv-Jaffa)	Eli Sprecher	75
Polen (Posen)	Marian Dmochowski	78
Polen (Warschau)	Cezary Kowalewski	75
Türkei (Antalya)	Soner Uzun	32
Schweiz (Bern)	Luca Borradori	36
Serbien (Belgrad)	Medenica Ljiljana	83
Italien (Rom)	Giovanni Di Zenzo	41
Griechenland (Thessaloniki)	Katerina Patsatsi	70
Tschechien (Brünn)	Hana Jedlickova	18
China (Peking)	Wenhan Li	35
Deutschland (Lübeck)	Susanne Lemcke	53
Insgesamt:		749

Die spätere Diagnostik der Seren anhand der BIOCHIP™-Technologie erfolgte verblindet, lediglich mit den Angaben des Geschlechts, Patientenalters, dem Datum der Blutentnahme und der DIF zu der jeweiligen Identifikationsnummer. Der Vergleich der aus der Analyse mit der BIOCHIP™-Technologie resultierenden Ergebnisse mit denen der DIF und der Routinemehrschrittverfahren aus der Arbeit von Tarek Fuhrmann erfolgte erst nach Abschluss der Diagnostik aller Patientenseren sowie der von 50 Blutspendern.

Das Alter der Patienten lag zwischen sieben und 95 Jahren ($63,1 \pm 18,32$). 56,8 Prozent waren weiblich, 43,2 männlich.

Bis zum weiteren Gebrauch im Oktober 2015 wurden die Seren bei -80°C gelagert.

Zu Beginn der Arbeit wurde in der EUROIMMUN AG Dassow eines der 250 μl Aliquots jedes Serums in Portionen von 35 μl in EuroCups aliquotiert, um in der weiteren Verwendung gezielt kleinere Portionen auftauen und verbrauchen zu können. Eine Hälfte dieser 35 μl Aliquots erhielt Tarek Fuhrmann für die Analyse der Seren mit den Routinediagnostikmethoden im LIED. Die restlichen EuroCups wurden bis zur Testung mit der BIOCHIP™-Technologie bei -80°C in der EUROIMMUN AG Groß Grönau gelagert.

2.2 Blutspenderseren

Als negative Kontrolle wurden 50 Seren von Blutspendern mit den BIOCHIP™-Mosaiken getestet. Die Seren stammten aus dem Institut für Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck (siehe Votum der Ethikkommission Anhang Abschnitt 7.5) und wurden nach der Blutentnahme randomisiert und eindeutigen Identifikationsnummern zugeordnet, die neben dem Entnahmedatum Angaben zu Geschlecht und Alter enthielten. Alle Seren waren den Spendern im Februar 2015 entnommen worden, um Doppeltspenden zu vermeiden. Der Mindestabstand zwischen zwei Blutspenden beträgt acht Wochen. 36 Prozent der Blutspender waren weiblich, 64 Prozent männlich. Das Alter lag zwischen 19 und 59 Jahren ($29,44 \pm 9,34$).

2.3 Analyse mittels der BIOCHIP™-Technologie

2.3.1 Herstellung der BIOCHIP™-Mosaik

Die Herstellung der mit BIOCHIPS™ bestückten Mosaik auf Objektträgern wurde nach dem *Verfahren zur Herstellung Festphasen-gebundener Bioreagenzien* der Firma EUROIMMUN AG durchgeführt: Dabei werden die Antigene (wie Gewebe, Antigen-exprimierende Zellen und aufgereinigte, rekombinante Proteine, welche als EUROPLUS® bezeichnet werden) nicht direkt auf den Objektträger aufgebracht, sondern auf ein Trägermaterial, z.B. ein Deckglas. Dieses wird mit chemischen Gruppen versehen, die spontan mit dem jeweiligen Antigen kovalente Bindungen eingehen, was stabile und haltbare Antigenstrukturen während der Inkubation und Waschschrte gewährleistet. Über ein virtuelles Raster werden Ausschnitte aus den Gewebe-, Zell- oder Proteinblöcken ausgewählt, voll automatisch ausgeschnitten, entnommen und auf den Objektträger in das entsprechende Mosaik positioniert.

In dieser Studie wurden zwei Mosaik verwendet. Folgende Gewebe befanden sich auf dem ersten und größeren Mosaik mit 12 BIOCHIPS™ (siehe Abb. 2.1): Ösophagus (Affe), Spalthaut (Primat), Harnblase (Affe), Leber (Affe) mit Serosa und Leber (Affe) mit Gallengängen. Neben den Geweben bestanden fünf BIOCHIPS™ aus Zellen der humanen Zelllinie HEK293, die als Zielantigene Dsg1, Dsg3, BP230-gC, Kollagen Typ VII NC1 und einen Leervektor als Negativkontrolle (EU90) exprimierten. Als EUROPLUS® befanden sich zudem rekombinantes BP180-NC16A-4X und Gliadin-GAF3x auf dem Mosaik.

Der Ösophagus diente zur Beurteilung von Autoantikörpern sowohl gegen desmosomale Strukturen als auch die der Basalmembran, während die Spalthaut die Differenzierung zwischen Zielantigenen im Blasendach (BP180, BP230) und Blasenboden (Laminin 332, Laminin γ 1/p200 Protein, Kollagen Typ VII) [192] ermöglichte. Zur Diagnose des paraneoplastischen Pemphigus waren die Harnblase, deren Urothel vermehrt Desmoplakin enthält [90], sowie die Leber mit Serosa geeignet. Firmeninterne Untersuchungen zeigten, dass die Serosa bei Positivität auf Envoplakin im paraneoplastischen Pemphigus starke Fluoreszenz aufweist. Zudem konnte hier die Beurteilung der Gallengänge in der Leber herangezogen werden, die ebenfalls wie das Urothel bei Autoantikörpern gegen Desmoplakin fluoreszieren [149]. Das Endomysium der Leber reagiert durch das

Zielantigen Gewebstransglutaminase bei Dermatitis herpetiformis im IgA mit einem charakteristischen Fluoreszenzmuster [55]. Diese Fluoreszenz des Endomysiums ist ebenfalls in der Schicht der Muscularis des Ösophagus nachweisbar. Als Zielantigen der Dermatitis herpetiformis diente das zusätzliche EUROPLUS® Gliadin-GAF3x (teilweise desamidiertes Gliadin-Derivat). Fluoreszenzreaktionen bei Dsg1 und Dsg3 ermöglichten die Diagnose von Pemphigus vulgaris und foliaceus, Fluoreszenzen bei BP230-gC und BP180-NC16A-4X die des bullösen Pemphigoids und Reaktionen bei Kollagen Typ VII NC1 die der Epidermolysis bullosa acquisita.

Das zweite und kleinere Mosaik enthielt acht BIOCHIPS™, alle bestehend aus transfizierten HEK293 Zellen (siehe Abb. 2.1). Sechs exprimierten Desmocollin 1, 2 und 3, jeweils einmal in Aceton und einmal in Formalin fixiert, um die Sensitivität des Mosaiks zu erhöhen. Die Fixierung mit Aceton steigert die Permeabilität der Zellen, was durch die Inkubation mit Fluorescein-markierten anti-humanen Antikörpern das Sichtbarmachen von auch sich im Zellinneren befindenden Zielantigenen ermöglicht, aber auch eine höhere Hintergrundfärbung zur Folge hat. Formalin fixiert die Zellen lediglich. Dadurch kann der Antikörper nur Strukturen an der Zelloberfläche binden und als Fluoreszenzmuster in der Mikroskopie darstellen. Zwei BIOCHIPS™ dienten auch hier jeweils für eine der Fixierungen als Kontrollchip (EU90).

Die standardgemäße Lagerung der Objektträger erfolgt bei +4°C, da sich durch eine Lagerung bei Minusgraden durch die für die Inkubation sinnvolle hydrophobe Beschichtung einzelne BIOCHIPS™ von den Mosaiken lösen können. Diese Lagerung führt allerdings zu einer verkürzten Haltbarkeit der Gewebe auf dem Mosaik. Um die Gewebeschnitte auf dem großen Mosaik dennoch für die gesamte Dauer der Studie haltbar machen zu können, wurde hier auf die hydrophobe Beschichtung verzichtet und die großen Mosaik bei -20°C eingefroren. Die hydrophoben Objektträger mit Desmocollin Mosaiken wurden nach Protokoll bei +4°C gelagert.

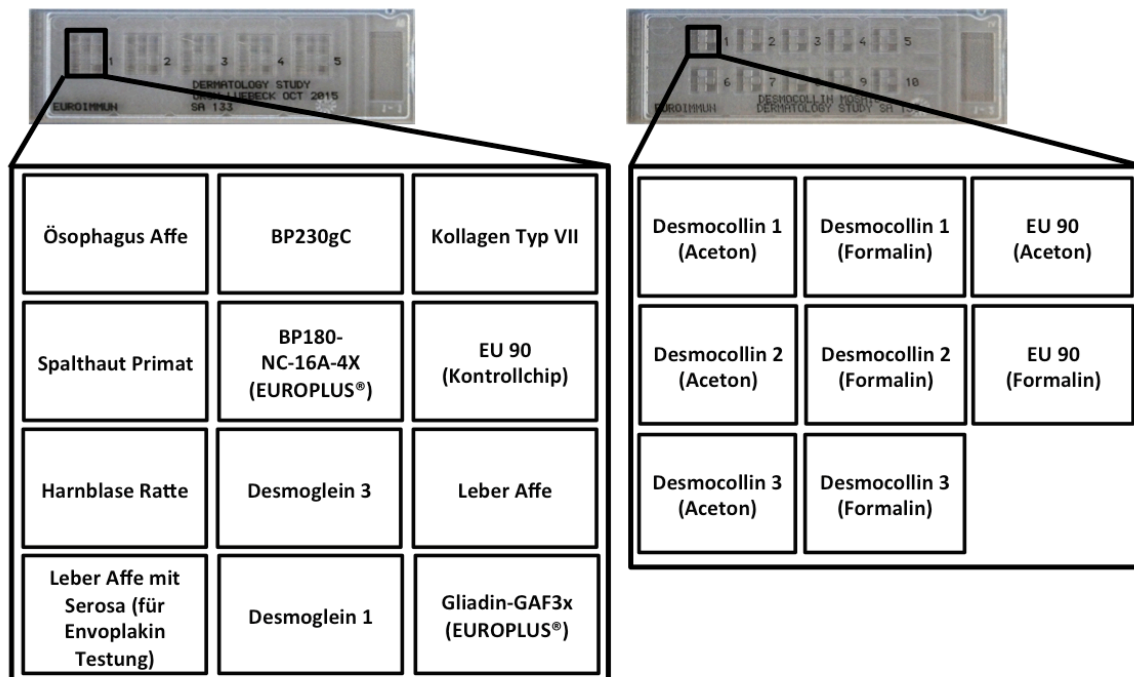


Abb. 2.1: Aufbau beider BIOCHIP™-Mosaik

2.3.2 Konjugat und Absorptionspuffer

Das Konjugat bestehend aus Fluorescein-markierten anti-humanen Antikörpern (IgA, IgG₍₁₋₄₎, IgG mit zusätzlich angereichertem IgG₄ und reines IgG₄) wurde standardgemäß nach der Herstellung bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren. Während der Nutzung im Studienablauf wurden die Konjugate in kleinen Portionen aufgetaut und bei +4°C gelagert.

Der Absorptionspuffer zur Eliminierung unspezifischer desmosomaler Reaktionen wurde zur Anwendung der indirekten Immunfluoreszenztests der EUROIMMUN AG zur Erkennung von Autoantikörpern gegen Strukturproteine der Haut beziehungsweise Schleimhaut von genanntem Hersteller entwickelt. Bis zur ersten Verwendung wurde der Puffer bei -20°C eingefroren und bis zum vollständigen Verbrauch nach Protokoll bei +4°C gelagert.

Vor Gebrauch wurden sowohl Konjugate als auch Absorptionspuffer gut durchmischt, um unterschiedlich starke Gewebereaktionen durch abgesetzte anti-humane Antikörper beziehungsweise Pufferbestandteile zu verhindern.

2.3.3 Inkubationsschritte und -schema

Die 749 Patientenseren sowie die der 50 Blutspender wurden mit der TITERPLANE-Technik von EUROIMMUN nach dem Protokoll des Herstellers inkubiert (siehe Abb. 7.3). Dabei ermöglichte die Lagerung der Objektträger auf dem mit dem Serum betropften Reagenzträger die gleichmäßig flächige und vor Verdunstung geschützte Inkubation der BIOCHIP™-Mosaiken. Sowohl Seren als auch Konjugat wurden schonend bei +4°C aufgetaut und betrogen zum Zeitpunkt der Inkubation Raumtemperatur, ebenso wie die Objektträger, die erst bei Raumtemperatur ausgepackt und mit Datum und Laufnummer beschriftet wurden, um Kondenswasser auf den Mosaiken zu vermeiden. Jedes Serum wurde in PBS-Tween 1:10 (55µl Serum in 500µl PBS-Tween) und 1:100 verdünnt und vor der Inkubation gut durchmischt. Die Mosaiken inkubierten mit den verdünnten Seren für 30 Minuten (70µl pro großem Mosaik, 30µl pro Desmocollin Mosaik). Nach Abspülen der Seren mit einem Schwall PBS-Tween und fünfminütigem Waschen in einer mit PBS-Tween gefüllten Küvette erfolgte eine weitere Inkubation der Mosaiken für 30 Minuten auf den Reagenzträgern mit dem FITC-markierten anti-humanen Antikörper (65µl pro großem Mosaik, 25µl pro Desmocollin Mosaik) unter Ausschluss direkter Sonneneinstrahlung, um mögliche Reaktionen mit den Zielstrukturen der Gewebe als Fluoreszenzmuster sichtbar zu machen. Nach einem weiteren fünfminütigen Waschschrift wurden die Objektträger mithilfe der Styropor-Eindeckhilfe mit Glycerol eingedeckt und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet (AXIO Imager.A1, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland).

Zum Inkubationsschema (siehe Abb. 2.2): In einem ersten Teil zur Analyse der Kohorte mittels der BIOCHIP™-Technologie und der Herausstellung des Vorteils des IgG₄ in der indirekten Immunfluoreszenz wurden beide Verdünnungen jedes Serums sowohl mit dem großen Mosaik als auch mit dem kleinen Desmocollin-Mosaik viermal mit verschiedenen Konjugaten inkubiert, IgA, IgG, des weiteren mit IgG zusätzlich angereichert mit IgG₄ (IgG/IgG₄) und schließlich in einer sequentiellen Inkubation erst mit IgG₄ und anschließend mit IgG. Hier wurden die BIOCHIP™-Mosaiken nach der Inkubation mit IgG₄ mit Glycerol eingedeckt und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Anschließend wurden die Deckgläser schonend in Küvetten mit PBS-Tween von den Objektträgern gelöst und diese in einem weiteren Waschschrift von dem Glycerol gereinigt. Dies

ermöglichte eine weitere 30minütige Inkubation der Mosaik auf Reagenzträgern mit IgG, um mögliche Unterschiede zwischen der Inkubation mit direkt mit IgG₄ angereichertem IgG und der sequentiellen Inkubation herausstellen zu können. Nach dem erneuten Eindecken mit Glycerol wurden sowohl die nachinkubierten Mosaik als auch die mit IgA, IgG und IgG/IgG₄ inkubierten mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Eine Ausnahme bei diesem Schema bildeten 11 Seren, bei denen nur insgesamt 35µl zur Verfügung standen. Diese wurden ebenfalls 1:10 (33µl Serum in 300µl PBS-Tween) und 1:100 verdünnt, die vollständige Inkubation mit dem großen Mosaik und dem Desmocollin-Mosaik erfolgte hier wegen begrenzter Probenmenge allerdings nur mit den Konjugaten IgA und IgG. Damit konnten diese Seren auf pathogene Autoantikörper untersucht und charakterisiert werden, wurden allerdings nicht in die Auswertung zu dem möglichen Vorteil des IgG₄ integriert.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten mögliche Vorteile der Verwendung eines Absorptionspuffers zur Vermeidung von unspezifischen desmosomalen Reaktionen auf dem Ösophagus, hervorgerufen durch Antikörper gegen die Blutgruppenantigene A und B, untersucht werden. Dementsprechend wurden aus der im ersten Teil charakterisierten Kohorte von 749 Patienten alle Seren, die diese unspezifischen Desmosomenreaktionen aufwiesen (n = 88), erneut inkubiert. Zusätzlich wurden die 50 Blutspenderseren als Negativkontrollen in diesen Teil mit eingeschlossen (auch diese wiesen überwiegend unspezifische desmosomale Reaktionen auf). 50 Seren von Patienten mit Pemphigus vulgaris und 50 von Patienten mit bullösem Pemphigoid wurden ebenfalls getestet, um mögliche Auswirkungen des Absorptionspuffers auf die anderen diagnosespezifischen Reaktionen an Gewebeschnitten des BIOCHIP™-Mosaiks analysieren zu können. Da mögliche Vorteile des Absorptionspuffers nur für die Gewebeschnitte, speziell für die desmosomalen Strukturen des Ösophagus, relevant sind, wurde in diesem Teil der Arbeit nur das große Mosaik mit 12 BIOCHIPs™ involviert. Eine zweite Untersuchung des Desmocollin-Mosaiks war hier nicht nötig. Die 1:10-Verdünnung der Serumproben erfolgte im Absorptionspuffer (33µl Serum in 300µl Absorptionspuffer), die Verdünnung zu 1:100 in PBS-Tween, wobei zwischen den Verdünnungen eine fünfminütige Inkubation des Serums mit dem Absorptionspuffer stattfand. Die Proben wurden

nach gutem Durchmischen nach oben beschriebenem Schema inkubiert. Verwendete Konjugate waren ebenfalls IgA, IgG, IgG/IgG₄ und sequentiell erst IgG₄, dann IgG. Die Auswertung erfolgte auch hier mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Um positive Screeningreaktionen der Seren auf den Desmocollin-Mosaiken in ihrer Aussagekraft einschätzen zu können, wurden alle Desmocollin-positiven Seren ein zweites Mal mit dem Desmocollin-Mosaik nach Anleitung des Herstellers inkubiert und analysiert. Zudem wurden alle Seren erneut mittels BIOCHIP™-Technologie untersucht, die in dem nach Abschluss der gesamten Inkubationen getätigten Vergleich mit den Resultaten der etablierten Routinediagnostik (IIF, ELISA, Western Blot aus der Arbeit von Tarek Fuhrmann) nicht erklärbare unklare oder divergente Ergebnisse zeigten.

Alle inkubierten Objektträger wurden vor und nach dem Ablesen bei +4°C lichtgeschützt gelagert.

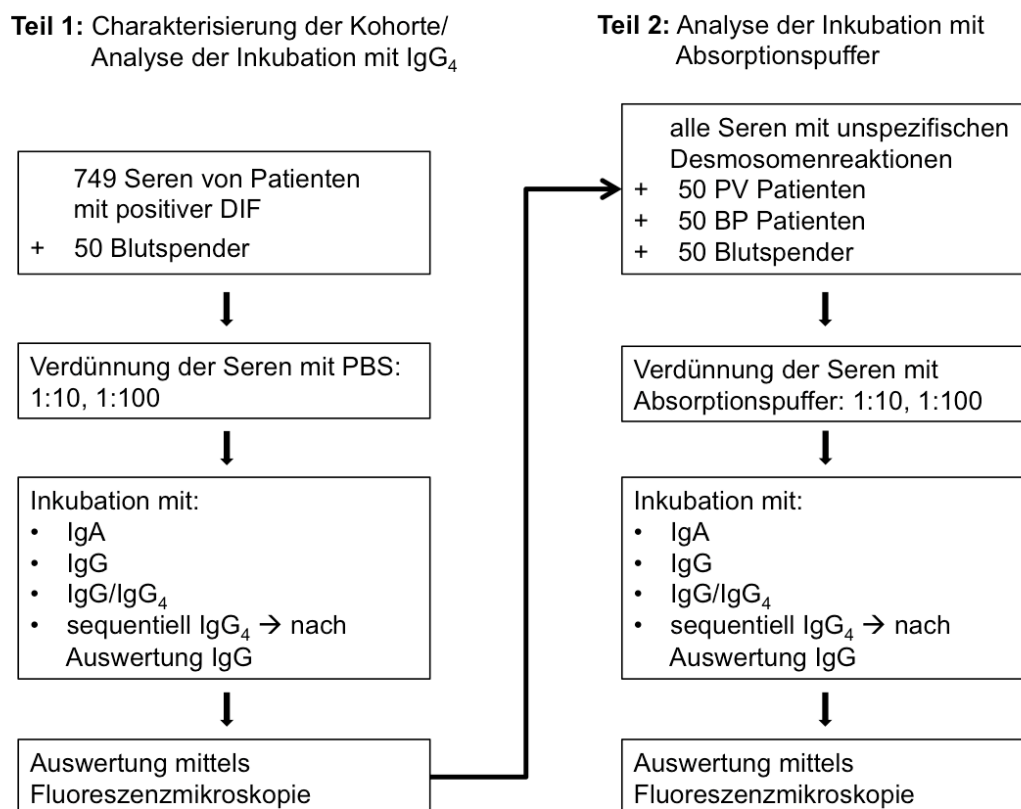


Abb. 2.2: Schema zum Inkubationsablauf bis zum ersten Vergleich der Daten der BIOCHIP™-Technologie und der Routinemehrschrittverfahren. DIF: direkte Immunfluoreszenz, PV: Pemphigus vulgaris, BP: bullöses Pemphigoid.

Der hier beschriebenen Inkubation und Auswertung der Studienserum ging eine zweimonatige Einarbeitungszeit voraus, in der ich im Diagnostiklabor der EUROIMMUN AG in Groß Grönu in der Routine mit einem täglichen Diagnostikdurchlauf von 400 bis 600 Patientenproben mitarbeitete und so die nötige Erfahrung für die Durchführung der Studie sammelte. Dabei erlernte ich die Inkubation und Auswertung von Patientenserum sowohl von bullösen Autoimmundermatosen als auch Krankheiten in nicht-dermatologischen Bereichen, die bereits durch vorhandene Mosaik mittels BIOCHIP™-Technologie diagnostiziert werden können, wie z.B. im Bereich der Neurologie, Rheumatologie und Infektiologie.

Zu der vorliegenden Arbeit wurden 799 Seren auf zwei Mosaiken mit insgesamt 20 BIOCHIPs™ und 240 Seren mit dem größeren Mosaik mit 12 BIOCHIPs™ in jeweils fünf Inkubationen analysiert, sodass insgesamt Immunfluoreszenzen von 188.600 einzelnen BIOCHIPs™ ausgewertet wurden.

2.3.4 Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie

Um bessere Lichtverhältnisse für das Ablesen am Fluoreszenzmikroskop zu schaffen und ein Ausbleichen der Fluoreszenzen auf den Objektträgern zu vermeiden, wurden die BIOCHIP™-Mosaik unter Ausschluss von Licht bei Raumtemperatur abgelesen. Die Immunfluoreszenzen wurden grundsätzlich unter dem 20er Objektiv betrachtet, teilweise (speziell die transfizierten Zellen) auch unter dem 40er Objektiv. Positive Fluoreszenzmuster wurden anhand der Stärke der Fluoreszenz der 1:10- und der 1:100-Verdünnung in Titerstufen angegeben. Dabei wurden halbe Titerstufen wie 1:32 geschätzt, wenn die Fluoreszenz in niedrigerer Verdünnung 1:10 noch sehr deutlich, in 1:100 allerdings nicht mehr zu sehen war. Zudem wurden sehr starke Fluoreszenzen in der 1:100-Verdünnung, die auch in mindestens einer weiteren Verdünnung noch sichtbar wären, mit 1:1000 geschätzt, bei einzelnen Ausreißern auch 1:3200. Eine serologische Diagnose wurde anhand der jeweiligen Kombinationen aus positiven Fluoreszenzmustern gestellt.

Zum großen Mosaik: Der Ösophagus diente der Analyse desmosomaler Strukturen sowie der Basalmembran. Eine feine, netzartige Fluoreszenz entlang

der Zellränder in der Epidermis und eine positive Fluoreszenz der mit Dsg1 transfizierten Zellen führte zur Diagnose Pemphigus foliaceus (hier zusätzlich auch in einzelnen Fällen Pemphigus erythematosus möglich). Ein klares desmosomales Muster und Positivität der Dsg3 exprimierenden Zellen oder auch Dsg1 und Dsg3 exprimierenden Zellen wurde als Pemphigus vulgaris diagnostiziert. Eine klinische Differenzialdiagnose wäre hier der Pemphigus vegetans. Bei zusätzlich starker Fluoreszenz der Schleimhaut der Harnblase und der Gallengänge oder Serosa auf der Leber wurde der Verdacht des paraneoplastischen Pemphigus geäußert, wobei die einzelne Beurteilung von Desmo- und Envoplakin auf dem BIOCHIP™-Mosaik nicht möglich war. Ein grobes, körnigeres Muster der Desmosomen und keine positive Reaktion der entsprechenden Zielantigene wurde als unspezifisches Wabenmuster notiert. Desmosomale Reaktionen und ein positives Desmoglein im IgA wurden als IgA-Pemphigus diagnostiziert. Eine deutliche durchgehende Fluoreszenz der Basalmembran auf dem Ösophagus, dem Blasendach der Spalthaut und Positivität eines oder beider Zielantigene BP180 und BP230 führte zur Diagnose bullöses Pemphigoid, eine positive Reaktion der Basalmembran auf Ösophagus und am Blasendach ohne die der Zielantigene erhielt den Verdacht auf bullöses Pemphigoid, wobei hier nur anhand der Serologie nicht zwischen den zusätzlich möglichen klinischen Diagnosen eines Schleimhautpemphigoids, eines Pemphigoid gestationis oder Lichen planus pemphigoides differenziert werden konnte. Eine Basalmembranfluoreszenz und Positivität der Zielantigene BP180 und BP230 in der IgA-Inkubation wurde als lineare IgA-Dermatose gewertet.

Ein spezifisches schmales Fluoreszenzmuster entlang des Blasenbodens und eine positive Fluoreszenz der mit Kollagen Typ VII transfizierten Zellen wurde als Epidermolysis bullosa acquisita diagnostiziert. Bei Positivität des Blasenbodens in der Spalthaut ohne entsprechendes Zielantigen wurde der Verdacht auf ein Anti-Laminin 332 Schleimhautpemphigoid geäußert, welches Typ Brunsting-Perry einschließt, sowie Anti-Laminin γ 1/p200 Pemphigoid, da das Mosaik keines der entsprechenden Zielantigene Laminin 332 oder Laminin γ 1/p200 Protein enthält, und eine eindeutige serologische Diagnose hier mittels BIOCHIP™-Technologie nicht möglich war.

Zur Diagnose der Dermatitis herpetiformis enthielt das Mosaik das EUROPLUS® Gliadin-GAF3x, welches wegen häufiger unspezifischer Reaktionen im IgG bei einem Titer von 1:10 nur als eindeutige Diagnose bei hohen Titerstufen ab 1:100 und einer positiven Reaktion des Endomysiums auf der Leber und dem Ösophagus im IgA gewertet wurde. Fehlende Fluoreszenz des Endomysiums, jedoch starke Fluoreszenz des Gliadins neben weiteren eindeutigen Fluoreszenzen einer der eben genannten Diagnosen, wurden als mögliche zusätzliche Zöliakieerkrankung notiert. Ein komplett negatives Mosaik oder lediglich eine spezifische desmosomale Reaktion ohne Positivität der Zielantigene wurde als negativ gewertet.

Zum Desmocollin-Mosaik: Positive Fluoreszenzergebnisse der mit den Desmocollinen 1 bis 3 transfizierten Zellen wurden als solche zusätzlich in der durch die Fluoreszenzen auf dem großen Mosaik gestellten Diagnose als Zielantigen notiert. Bestand neben der positiven Reaktion eines der Desmocolline nur eine spezifische Reaktion der desmosomalen Strukturen, lautete die Diagnose atypischer Pemphigus.

Zu der Auswertung der Blutspenderseren: Auch hier wurden alle Fluoreszenzmuster der Zielstrukturen bullöser Autoimmundermatosen als Titer notiert. Dabei wurden alle Reaktionen von desmosomalen Strukturen, der Basalmembran oder der Schleimhäute auf den Geweben als die Spezifität herabsetzende unspezifische Reaktionen gewertet, sofern die Zielantigene negativ ausfielen. Eine positive Fluoreszenz der Zielantigene wurde vorerst als spezifische Reaktion und damit der entsprechende Blutspender als Patient mit Autoantikörpern ohne Klinik gewertet und daraufhin das Serum mittels ELISA auf Autoantikörper gegen das entsprechende Antigen weiter untersucht. Eine Ausnahme bildeten hier positive Ergebnisse bei dem EUROPLUS® Gliadin-GAF3x, da diese bereits bei den Studienserum im IgG häufig in dem Titerbereich 1:10 unspezifisch reagierten. So wurden diese Reaktionen auch hier bis zu einer Titerstufe von 1:10 und fehlender Fluoreszenz des Endomysiums im IgA ohne weitere Analyse im ELISA als unspezifisch gewertet. Positive Reaktionen auf dem Desmocollin-Mosaik wurden wie oben beschrieben ein zweites Mal mit einem Desmocollin-Mosaik mittels IIF getestet, um die Aussagekraft des ersten Ergebnisses zu überprüfen.

Nach der vollständigen Auswertung aller mit PBS verdünnten Seren inklusive der Blutspender wurden diese Diagnosen mit denen der DIF der einzelnen Zentren sowie der Ergebnisse der Routinediagnostikverfahren in der Arbeit von Tarek Fuhrmann verglichen und auf Sensitivität und Spezifität der BIOCHIP™-Technologie hin analysiert.

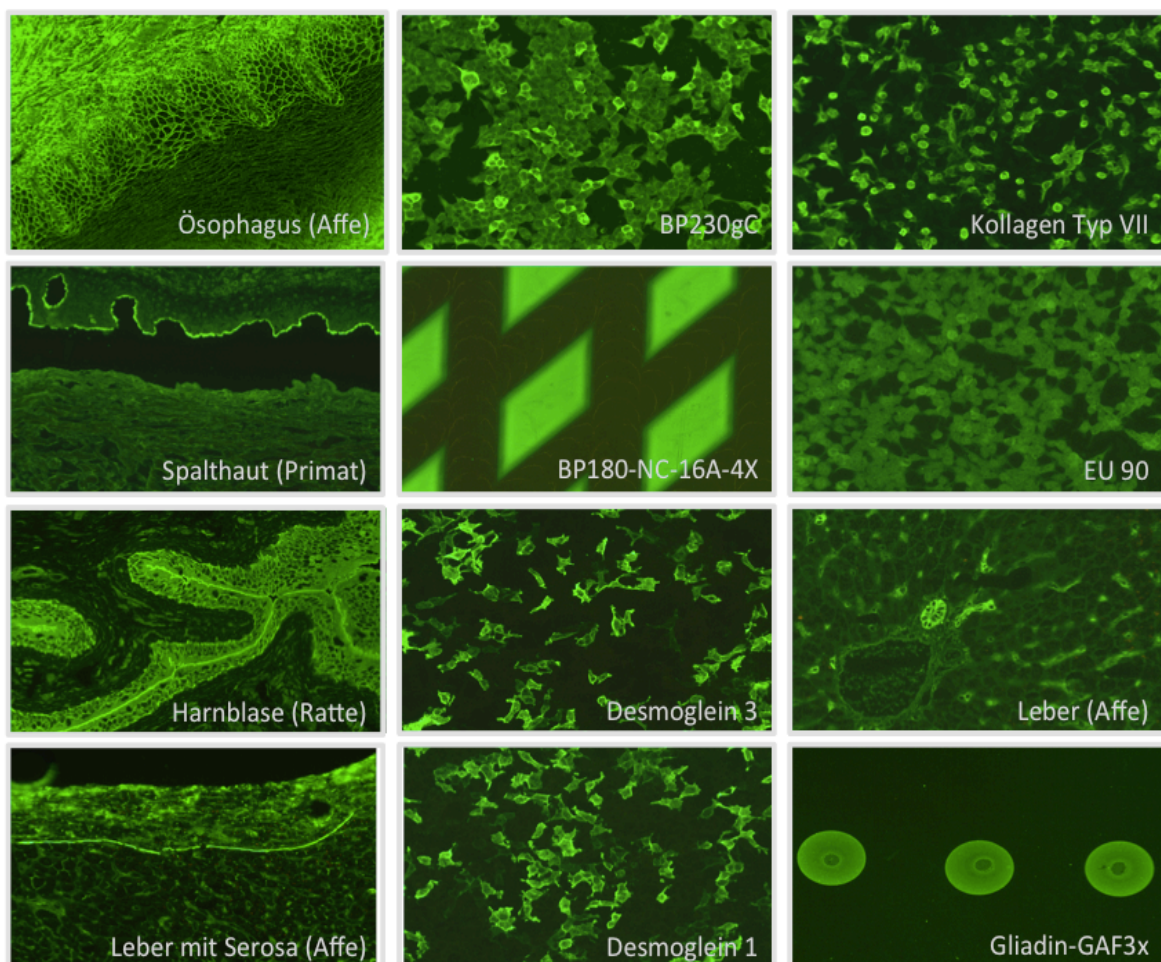


Abb. 2.3: Beispiele positiver Immunfluoreszenzen für die 12 BIOCHIPs™ des großen Mosaiks: Ösophagus mit interzellulärer, netzartiger Fluoreszenz bei Pemphigus; Spalthaut mit gerader linienförmiger Fluoreszenz am Blasendach bei bullösem Pemphigoid; Harnblase mit Urothelreaktivität bei paraneoplastischem Pemphigus, Leber mit fluoreszierender Serosa und Gallengängen bei paraneoplastischem Pemphigus sowie spezifische Fluoreszenzreaktionen der Zielantigene BP230-gC und BP180 für bullöses Pemphigoid, Dsg1 und Dsg3 für Pemphigus foliaceus und Pemphigus vulgaris, Kollagen Typ VII für Epidermolysis bullosa acquisita und Gliadin-GAF3x für Dermatitis herpetiformis. Die EU90-Zellen als Negativkontrolle zeigen keine Fluoreszenz.

2.4 Analyse positiver Blutspender mittels ELISA

Blutspenderseren, die positive Fluoreszenzen für die Zielantigene BP180 oder Dsg3 aufwiesen, wurden im Verlauf auf tatsächliche Autoantikörper gegen die entsprechenden Zielstrukturen mithilfe des Anti-BP180-NC16A-4X-ELISAs (IgG) [184] und des Anti-Dsg3-ELISAs (IgG) [168] untersucht. Der ELISA-Testsatz der EUROIMMUN AG enthielt alle nötigen Substanzen in fertig verwendbarer Form, bis auf den Waschpuffer, der vor Gebrauch 1:10 in Aqua dest. verdünnt wurde. Der ELISA-Testsatz wurde bis zur Verwendung bei +4°C gelagert und befand sich, ebenso wie die Serumproben der Blutspender, zum Zeitpunkt der Inkubation auf Raumtemperatur. Die Proben wurden gemäß Anleitung des Herstellers (siehe Abb. 7.4) im Probenpuffer 1:101 verdünnt (5µl Serum in 500µl Probenpuffer) und jeweils 100µl der verdünnten Proben sowie der Kalibratoren, der Positiv- und der Negativkontrolle in die einzelnen Reagenzgefäße pipettiert. Nach einer 30minütigen Inkubation wurden die Reagenzgefäße manuell dreimal mit dem verdünnten Waschpuffer gewaschen und daraufhin diese weitere 30 Minuten mit jeweils 100µl Konjugat (Enzym-markiertem Anti-Human-IgG) inkubiert. Nach einem weiteren manuellen Waschschrift folgte lichtgeschützt eine 15minütige Inkubation mit jeweils 100µl Substrat. Daraufhin wurde die enzymatische Reaktion zwischen Konjugat und Substrat durch jeweils 100µl Stopplösung unterbrochen und direkt im Anschluss der ELISA bei einer Messwellenlänge von 450nm ausgewertet. Die Messungen wurden in relativen Einheiten (RE) je Milliliter angegeben und anhand einer linearen Kurve der Messwerte der Kalibratoren, aufgetragen gegen die Extinktion, bestimmt. Werte kleiner als 20 RE/ml empfahl der Hersteller bei quantitativer Auswertung als negativ zu werten, Werte größer oder gleich 20 RE/ml galten als positiv.

2.5 Statistik

Zur Darstellung der Korrelation zwischen den Ergebnissen der etablierten Mehrschritt Diagnostik (ermittelt in der Arbeit von Tarek Furhmann) und der BIOCHIP™-Technologie wurden für die einzelnen Krankheitsgruppen Krankheits- und Antikörperhäufigkeiten ausgezählt und das Cohens Kappa (κ) errechnet:

$$\kappa = \frac{p_{\text{gemessen}} - p_{\text{erwartet}}}{1 - p_{\text{erwartet}}}$$

wobei p_{gemessen} die gemessene Übereinstimmung der Ergebnisse anhand der Summe aller identisch Positiven und Negativen, dividiert durch die Summe aller, ist und p_{erwartet} die stochastisch erwartete Übereinstimmung (Summe der multiplizierten Anteile Positiver beider Verfahren und Negativer beider Verfahren). Bei κ größer 0,81 ist von einer fast vollkommenen Übereinstimmung der Ergebnisse auszugehen (Landes und Koch 1977).

Um die Signifikanz der Unterschiede zwischen Inkubationen mit IgG- und mit IgG₄ angereichertem IgG-Konjugat herauszustellen (ebenso wie die Unterschiede zwischen Inkubationen mit angereichertem IgG-Konjugat und sequentieller Inkubation), wurden die Titer als logarithmierte Daten mithilfe des U-Tests nach Mann-Whitney verglichen (Signifikanzniveau $p=0,05$), da es sich um skalierte, unverbundene, nicht normal verteilte Daten handelt. Aus den jeweiligen Logarithmen der Titer der unterschiedlichen Inkubationen wurden zudem jeweils Mittelwerte gebildet. Die zueinander ins Verhältnis gesetzten Mittelwerte stellten den Faktor der Titererhöhung der einzelnen Inkubationen dar und dienten als Vergleichsmaß zwischen den verschiedenen Inkubationsarten. Dieses statistische Vorgehen wurde auch bei der Bestimmung möglicher Intensitätsunterschiede in der Fluoreszenz bei der Inkubation mit Absorptionspuffer angewandt. Die unspezifischen desmosomalen Reaktionen ohne und mit Absorptionspuffer als dichotome unverbundene Variablen wurden ausgezählt und mittels Chi-Quadrat-Test ausgewertet (Signifikanzniveau $p=0,05$).

Für die Auswertung der Ergebnisse und Anwendung statistischer Testverfahren wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel (Version 2013) sowie die Statistiksoftware IBM SPSS Statistics 23 verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Leistungsfähigkeit des großen BIOCHIP™-Mosaiks

3.1.1 Ergebnisse der serologischen Diagnostik der Studienserum mittels BIOCHIP™-Technologie

Aus den 749 Patientenserum wurden 711 (94,8%) Diagnosen mittels BIOCHIP™-Technologie erhoben (siehe Tab. 3.1), wobei das Serum *Tel Aviv 069* sowohl Gewebereaktionen und Zielantigene für bullöses Pemphigoid als auch Pemphigus vulgaris (positive Reaktionen bei Dsg3, BP180 und BP230) zeigte und daher von insgesamt **750 möglichen Diagnosen bei 749 Studienserum** ausgegangen wird. Bei 18 (2,4%) Serum konnte keine Diagnose wegen fehlender Fluoreszenzen auf den BIOCHIPs™ gestellt werden. 371 (49,5%) Serum zeigten Fluoreszenzreaktionen für bullöses Pemphigoid, 250 von diesen für das Zielantigen BP180, drei für BP230. 94 Serum zeigten positive Reaktionen für beide Zielantigene. 24 Serum wurden anhand eindeutiger Fluoreszenz am Blasendach als Verdacht auf bullöses Pemphigoid gewertet (siehe Kapitel 2.3.4).

Tab. 3.1 Aufteilung der serologischen Diagnosen der Studienserum*

Diagnose	Anzahl					Diagnose	Anzahl	
PV	gesamt	Zielantigene (%)				Blasenboden- fluoreszenz ohne Kollagen VII	21	
		Dsg3 + Dsg1		Dsg3				
		193 (75,1%)		64 (24,9%)				
PF	68							
PNP	4					EBA	4	
BP **	gesamt	Zielantigene (%)				LAD	6	
		BP180 + BP230	BP180	BP230	Blasendachfluoreszenz ohne Zielantigene	DH	1	
		371	94 (25,3%)	250 (67,4%)	3 (0,8%)	24 (6,5%)	Keine Diagnose	18

* 711 Diagnosen konnten aus 749 Studienserum mittels BIOCHIP™-Technologie erhoben werden. PV: Pemphigus vulgaris, PF: Pemphigus foliaceus, PNP: paraneoplastischer Pemphigus, BP: bullöses Pemphigoid, EBA: Epidermolysis bullosa acquisita, LAD: Lineare IgA-Dermatose, DH: Dermatitis herpetiformis, Dsg: Desmoglein. **Da das Serum *Tel Aviv 069* sowohl für Pemphigus vulgaris als auch bullöses Pemphigoid positiv reagierte, werden in dieser Aufstellung und auch in den folgenden insgesamt 750 Diagnosen bei 749 Studienserum betrachtet.**

** eine Differenzierung zu Schleimhautpemphigoid, Pemphigoid gestationis und Lichen planus pemphigoides war nicht möglich.

Für Pemphigus vulgaris typische Fluoreszenzreaktionen zeigten 257 (34,3%) Seren, wobei bei 193 Dsg3 und Dsg1 positiv reagierten, bei 64 Seren lediglich das Zielantigen Dsg3. Weitere 68 (9,1%) der Seren erhielten die Diagnose Pemphigus foliaceus. Die restlichen zwei Prozent der diagnostizierten Seren teilten sich in folgende serologische Diagnosen: Vier (0,53%) erhielten die Diagnose paraneoplastischer Pemphigus, vier Epidermolysis bullosa acquisita (0,53%), sechs (0,8%) lineare IgA-Dermatose und eines (0,13%) Dermatitis herpetiformis.

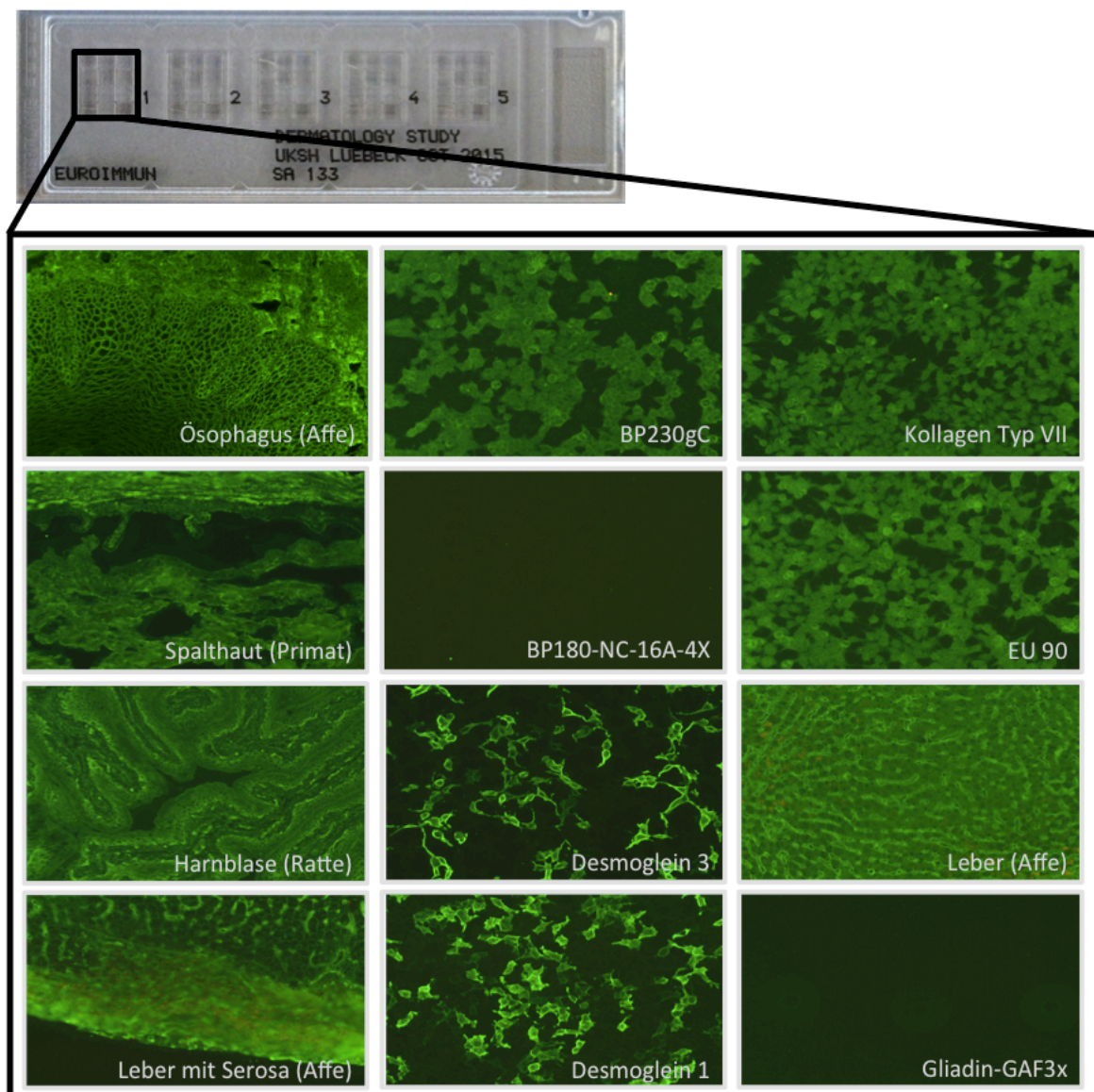


Abb. 3.1: Fluoreszenzmuster eines Patienten mit Pemphigus vulgaris (*Thessaloniki 032, 1:10, IgG, PBS-T*): Auf dem Ösophagus zeigt sich die für Pemphigus vulgaris charakteristische interzelluläre, netzartige Immunfluoreszenz, alle anderen Gewebeschnitte sind negativ. Als Zielantigene reagieren sowohl Dsg3 als auch Dsg1 positiv.

21 (2,8%) Seren konnten durch mangelnde Zielantigene auf dem BIOCHIP™-Mosaik zwar keine Diagnose zugeteilt, aber durch vorhandene Fluoreszenzen im Bereich der Basalmembran und des Blasenbodens der Spalthaut der Verdacht der Diagnose Anti-Laminin 332 Schleimhautpemphigoid oder Anti-Laminin γ 1/p200 Pemphigoid geäußert werden.

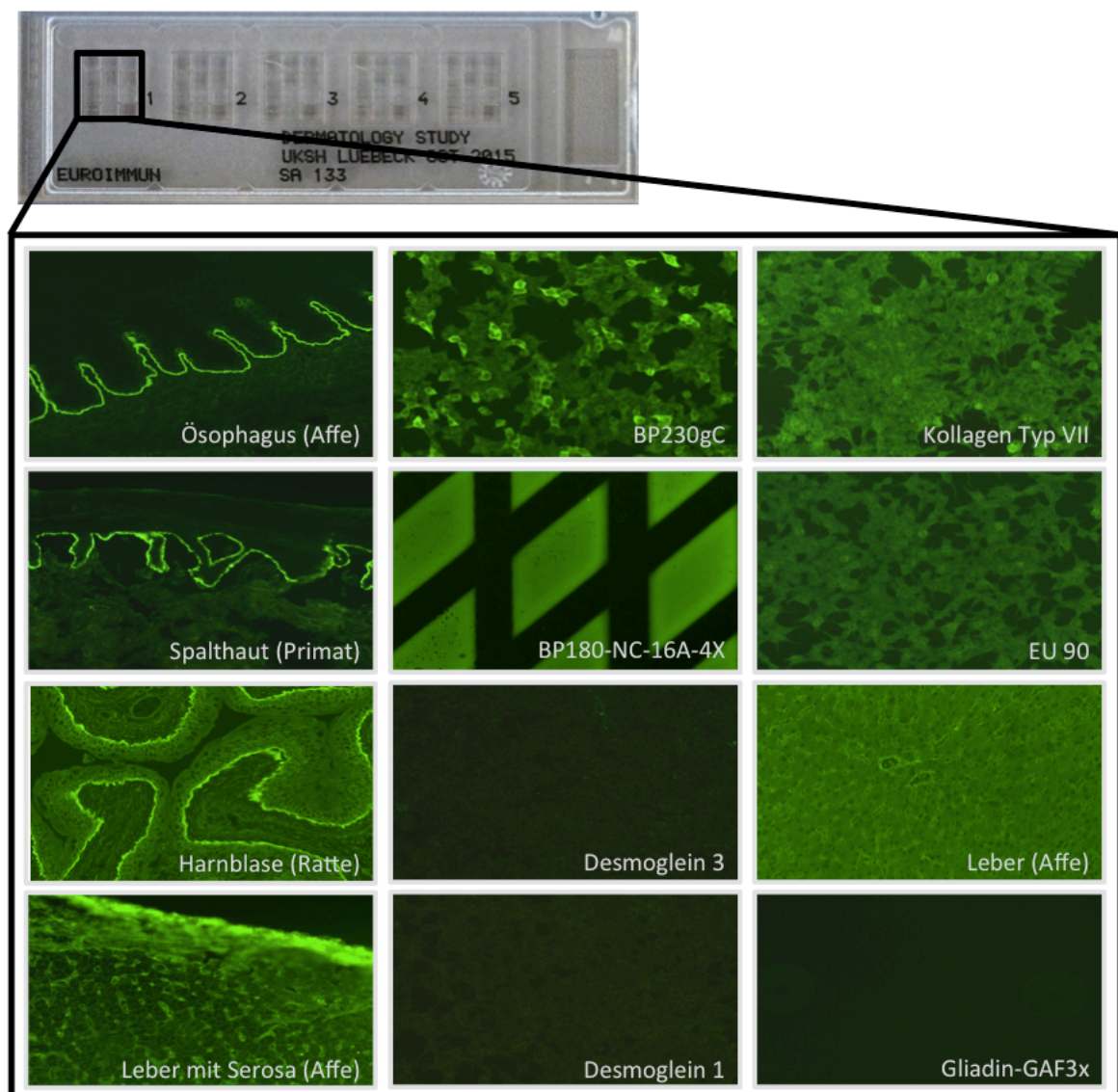


Abb. 3.2: Fluoreszenzmuster eines Patienten mit bullösem Pemphigoid (Antalya 024, 1:10, IgG/IgG₄, PBS-T): Die Basalmembran zeigt eine lineare Immunfluoreszenz auf dem Ösophagus und auch auf der Harnblase entlang des Urothels. Das Urothel selber und die anderen Gewebeschnitte weisen keine Fluoreszenzreaktionen auf. Auf der Spalthaut reagiert das Blasendach ebenfalls mit einem linearen Fluoreszenzmuster. Serologisch positive Zielantigene sind hier sowohl BP180 als auch BP230.

3.1.2 Korrelation der Diagnosen des BIOCHIP™-Mosaiks mit der direkten Immunfluoreszenz und der etablierten Mehrschrittdiagnostik

Mittels DIF wurden in den Kooperationszentren 333 Seren als Pemphigus- und 416 als Pemphigoiderkrankungen diagnostiziert. Das BIOCHIP™-Mosaik ermittelte 329 (98,8%) der Pemphigus- und 402 (96,6%) der Pemphigoidseren, die etablierte Mehrschrittdiagnostik 317 (95,2%) der Pemphigus- und 409 (98,3%) der Pemphigoidseren (siehe Abb. 3.3). Im Vergleich zwischen etablierter Mehrschrittdiagnostik und BIOCHIP™-Technologie bei den einzelnen Krankheitsentitäten betrugen die Cohens Kappa Werte als Maß der Interrater-Reliabilität zwischen 0,84 und 1,00, bzw. 0,00 bei Diagnosen, die durch fehlende Zielantigene auf dem Mosaik durch die BIOCHIP™-Technologie nicht ermittelt werden konnten (siehe Abb. 3.4). Das BIOCHIP™-Mosaik konnte bei 39 Seren keine Diagnose erheben (die etablierte Mehrschrittdiagnostik bei 25 Seren), bei 21 Seren durch oben genannten Grund, bei 18 durch vollständig fehlende Immunfluoreszenzen (siehe Kapitel 3.1.1). Das Verhältnis von Pemphigus- zu Pemphigoiderkrankungen bei den nicht diagnostizierten Seren (eingeteilt anhand der DIF) betrug bei der BIOCHIP™-Technologie 4 (10,3%) zu 35 (89,4%), bei den etablierten Verfahren 16 (64%) zu 9 (36%). Die genauere Betrachtung des Vergleichs der beiden Diagnostikmethoden zeigte bei der Gruppe der Pemphigus-erkrankungen 25 inkongruente Diagnosen und 34 kongruente, bei denen allerdings die Zielantigene differierten (siehe Abb. 3.5).

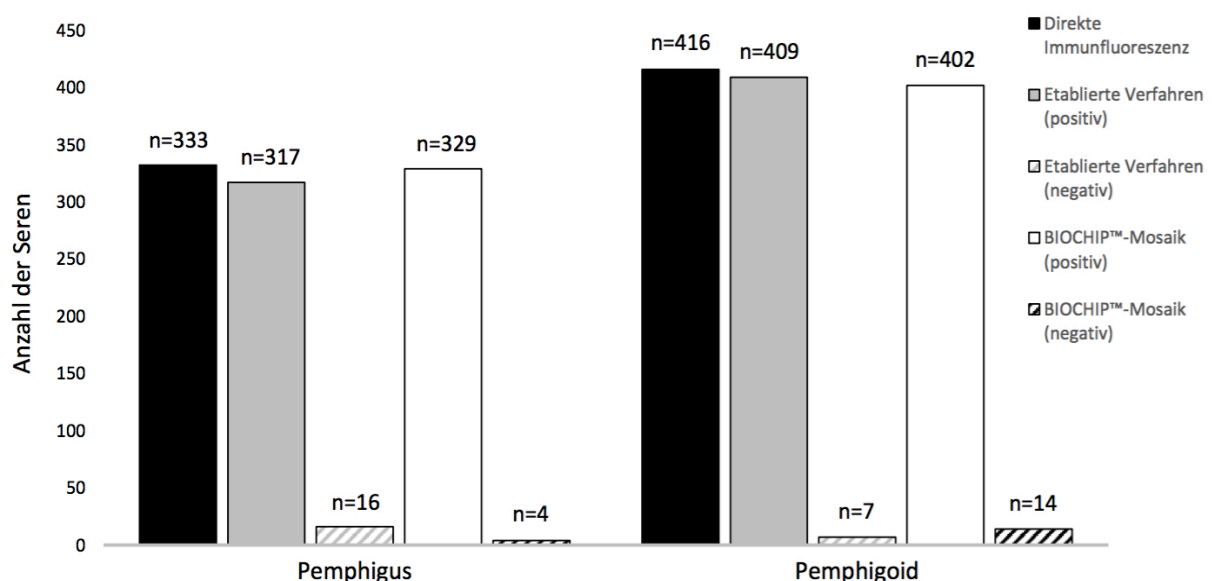


Abb. 3.3: Verteilung der serologischen Diagnosen von direkter Immunfluoreszenz, etablierter Mehrschrittdiagnostik und BIOCHIP™-Technologie in Pemphigus und Pemphigoid

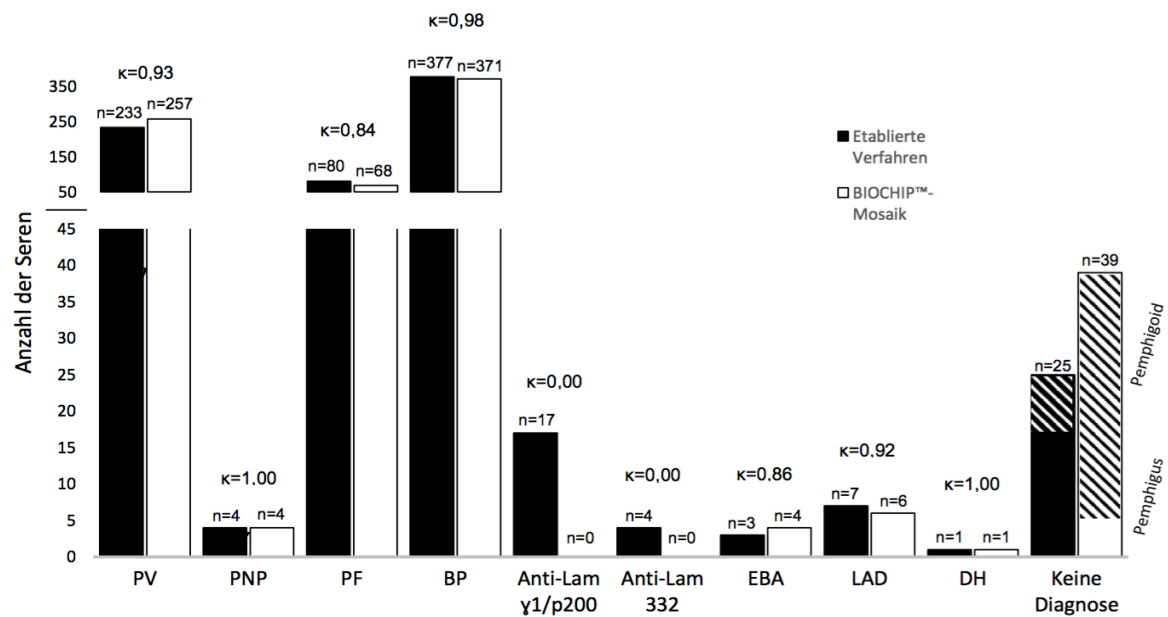


Abb. 3.4: Verteilung der serologischen Diagnosen von etablierter Mehrschrittdiagnostik und BIOCHIP™-Technologie in den einzelnen Krankheitsentitäten. PV: Pemphigus vulgaris, PNP: paraneoplastischer Pemphigus, PF: Pemphigus foliaceus, BP: bullöses Pemphigoid, Anti-Lam γ 1/p200: Anti-Laminin γ 1/p200 Pemphigoid, Anti-Lam 332: Anti-Laminin 332 Schleimhaut-pemphigoid, EBA: Epidermolysis bullosa acquisita, LAD: Lineare IgA-Dermatose, DH: Dermatitis herpetiformis.

Bei 12 der 25 inkongruenten Seren ermittelte das BIOCHIP™-Mosaik die Diagnose Pemphigus vulgaris mit den Zielantigenen Dsg3 und Dsg1, die Mehrschrittdiagnostik fand ebenfalls Anti-Dsg3- und Anti-Dsg1-Antikörper mittels entsprechendem ELISA-Testsystem, wobei die Anti-Dsg3-Antikörper-Werte unter dem cut-off blieben und damit als negativ gewertet und in diesen Fällen die Diagnose Pemphigus foliaceus angenommen wurde. 12 weitere Fälle zeigten bei der BIOCHIP™-Technologie die Diagnose Pemphigus vulgaris mit positiven Immunfluoreszenzen der Dsg3-exprimierenden Zellen. Bei 10 der 12 Seren betrug die Anti-Dsg3-Antikörper-Menge im ELISA-Testsystem Werte unter dem vorgegebenen cut-off, bei zwei wurden keine Antikörper nachgewiesen, weshalb in allen Fällen in der Mehrschrittdiagnostik keine Diagnose erhoben werden konnte. Ein Serum der 25 inkongruenten wies über das Desmocollin-Mosaik Anti-Dsc1-Antikörper auf, welche in der Erhebung der Mehrschrittdiagnostik nicht integriert waren und somit ebenfalls nicht diagnostiziert wurden. Alle der 34 kongruenten Seren mit inkongruenten Zielantigenen erhielten die Diagnose Pemphigus vulgaris, wobei Dsg3 und Dsg1 als Zielantigene mittels BIOCHIP™-Mosaik ermittelt wurden, während Antikörper gegen Dsg1 im ELISA-Testsystem nicht nachweisbar oder wiederum unter cut-off waren.

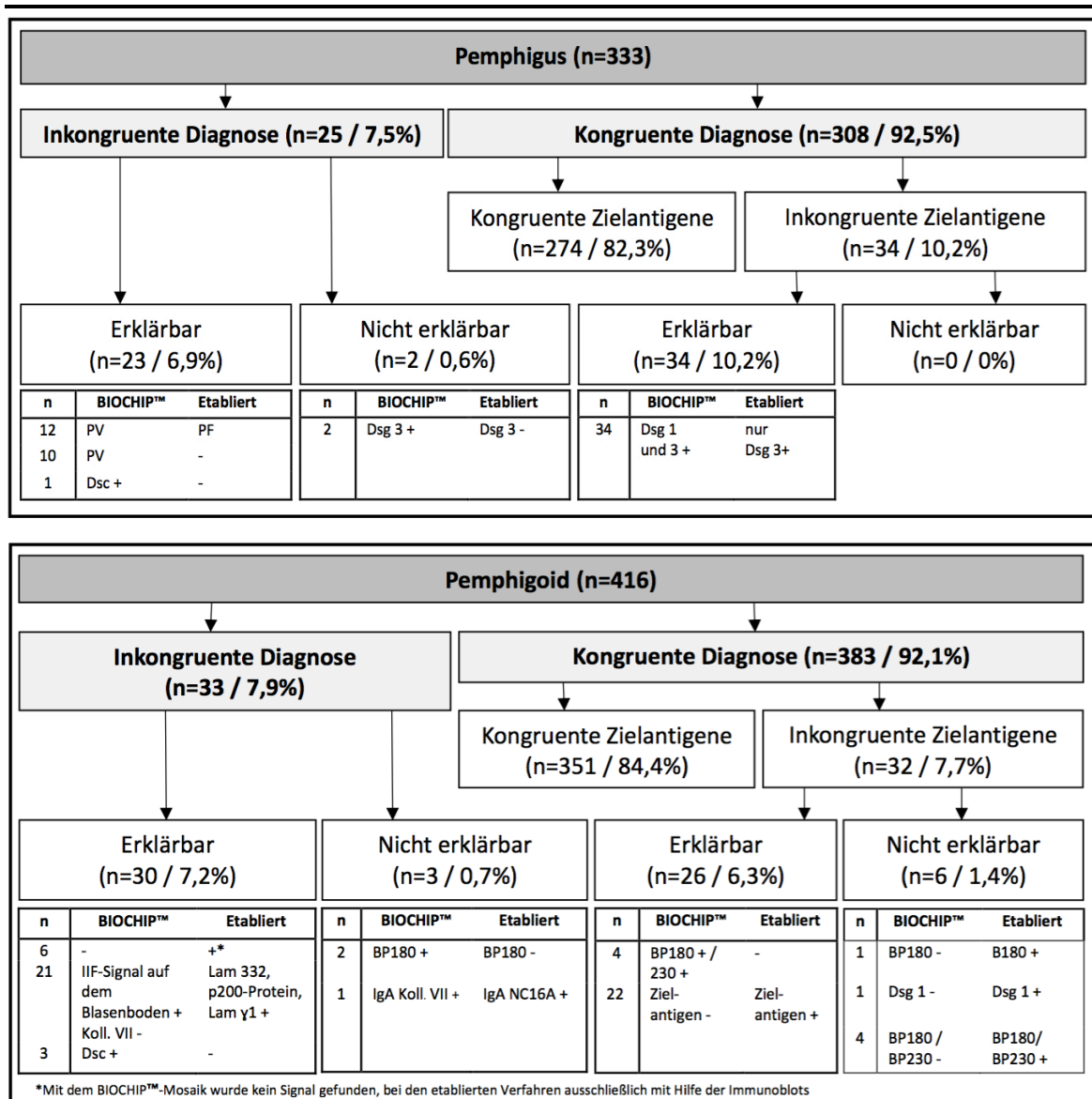


Abb. 3.5 und 3.6: Aufschlüsselung der inkongruenten Diagnosen und Zielantigene zwischen etablierter Mehrschritt Diagnostik und BIOCHIP™-Technologie für Pemphigus und Pemphigoid. PV: Pemphigus vulgaris, PF: Pemphigus foliaceus, Dsg: Desmoglein, Dsc: Desmocollin, Lam 332: Laminin 332, Lam γ1: Laminin γ1 Protein, Koll. VII: Kollagen Typ VII.

Bei der Pemphigoidgruppe zeigten bei Vergleich der beiden Diagnostikverfahren 33 Seren inkongruente Diagnosen und 32 inkongruente Zielantigene bei kongruenter Diagnose (siehe Abb. 3.6). Inkongruente Diagnosen wiesen sechs Seren auf, die sowohl auf dem BIOCHIP™-Mosaik als auch bei der IIF der Mehrschritt Diagnostik kein Signal zeigten und lediglich der IgG-LAD-1-Western Blot Antikörper nachweisen konnte sowie 21 Seren mit Diagnose Schleimhautpemphigoid und Anti-Laminin γ1/p200 Pemphigoid in der Mehrschritt Diagnostik (siehe Kapitel 3.1.1). Zusätzlich traten bei drei Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid Anti-Dsc1-Antikörper auf, bei zwei Seren mit

Diagnose bullöses Pemphigoid konnte BP180 als Zielantigen ausschließlich mittels BIOCHIP™-Technologie nachgewiesen werden und ein Serum zeigte auf dem BIOCHIP™-Mosaik in der Inkubation mit IgA-Konjugat Reaktivität gegen Kollagen Typ VII, während die etablierte Mehrschrittdiagnostik mittels IgA-NC16A-Western Blot die Diagnose lineare IgA-Dermatose stellte. Inkongruente Zielantigene im Bereich der kongruenten Diagnosen wiesen vier Seren mit Diagnose bullöses Pemphigoid mit zusätzlichem Nachweis von Antikörpern gegen BP180 oder BP230 auf dem BIOCHIP™-Mosaik auf. Bei 24 Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid konnte die Diagnose bei der BIOCHIP™-Technologie über gewebespezifische Fluoreszenzmuster ohne entsprechende Zielantigene und bei der Mehrschrittdiagnostik in 22 Fällen mit Zielantigenermittlung über Western Blot, in zwei Fällen über ELISA-Testung erhoben werden. Zusätzlich hatten zwei Seren in der etablierten Mehrschrittdiagnostik nicht diagnoserelevante Reaktivität gegen BP180 und Dsg1.

Von den insgesamt 124 inkongruenten Ergebnissen zeigten 53,2 Prozent inkongruente Zielantigene bei kongruenter Diagnose (siehe Abb. 3.7). 24,2 Prozent wiesen inkongruente Diagnosen durch zusätzliche Fluoreszenzsignale der BIOCHIP™-Technologie auf.

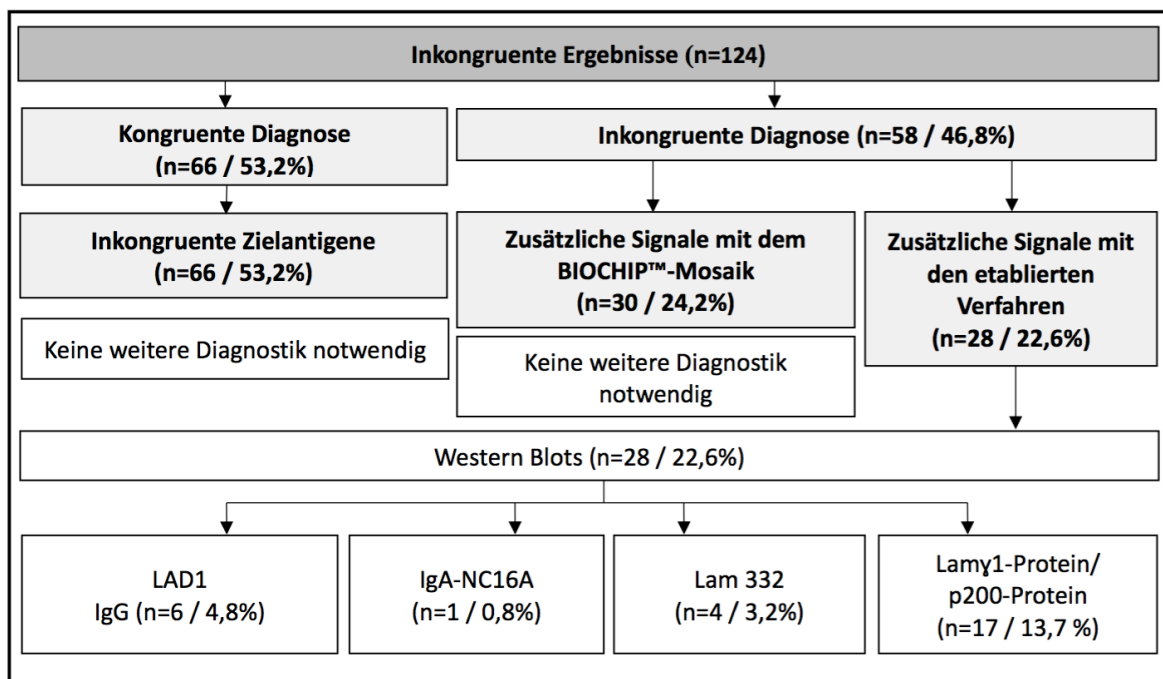


Abb. 3.7: Aufschlüsselung der inkongruenten Ergebnisse in Hinsicht auf notwendige Diagnostik, die zur Erfassung aller Diagnosen der BIOCHIP™-Technologie erfolgen muss. LAD1: Lineare IgA-Dermatose Antigen 1, Lam 332: Laminin 332, Lam γ 1: Laminin γ 1.

Die verbleibenden 28 Seren (22,6%) zeigten inkongruente Diagnosen aufgrund von zusätzlichen diagnoserelevanten Signalen in der etablierten Mehrschrittdiagnostik, welche alle über durchgeführte Western Blots ermittelt wurden. Der größte Anteil der Signale mit 13,7 Prozent der 124 inkongruenten Ergebnisse konnte mithilfe des Laminin γ 1/p200 Protein-Blots detektiert werden. 3,2 Prozent wurden über den Laminin 332-Blot ermittelt, 4,8 Prozent über den IgG-LAD-1-Blot und eine Serumdiagnose konnte über den IgA-NC16A-Blot gestellt werden. Das heißt, annähernd die Hälfte der letztlich inkongruenten Diagnosen zeigte Antikörper gegen spezielle Zielantigenstrukturen, die nur mittels Western Blot detektiert werden konnten.

3.1.3 Ergebnisse der serologischen Diagnostik der Blutspenderseren

Von den 50 getesteten Blutspendern wiesen vier Seren spezifische Immunfluoreszenzen auf Geweben und rekombinanten Zielantigenen auf, eines von diesen auf dem Desmocollin-Mosaik (siehe Kapitel 3.2). Eines der restlichen drei zeigte Reaktivität für Dsg3 mit einem Titer von 1:10. Der im Anschluss durchgeführte Anti-Desmoglein 3-ELISA-Test ergab einen Wert von 2,3 RE/ml, der damit unter dem vom Hersteller angegeben cut-off von 20 RE/ml lag und somit als negativ gewertet wurde. Die zwei anderen Seren wiesen positive Reaktionen gegen BP180 auf, eines ebenfalls mit einem Titer von 1:10 (Anti-BP180-NC16A-4X-ELISA-Wert: 4,0 RE/ml, ebenfalls unter cut-off) und eines mit einem Titer von 1:100, bei dem das ELISA-Testsystem einen Wert von 21,1 RE/ml ermittelte und damit das Ergebnis der BIOCHIP™-Technologie als richtig positiv gewertet wurde. Damit wurden zwei Seren (nachgewiesene Reaktivität gegen Dsc1, siehe Kapitel 3.2, und BP180) als richtig positiv gewertet, 46 der verbleibenden 48 Blutspenderseren (96%) als richtig negativ.

Unspezifische Immunfluoreszenzreaktionen im Bereich der Gewebe ohne entsprechende Beteiligung der Zielantigene (unspezifische desmosomale Fluoreszenzreaktionen siehe Kapitel 3.3.1) traten bei den 49 negativ getesteten Blutspenderseren bei Inkubation mit IgA-Konjugat lediglich bei Leber im Bereich der Gallengänge auf (28,6%). In den Inkubationen mit IgG-Konjugaten zeigten sich unspezifische Fluoreszenzreaktionen auf der Spalthaut im Bereich des

Blasendachs (IgG: 18,4%, IgG/IgG₄: 40,8%, sequentielle Inkubation: 4,1%), im Bereich des Blasenbodens (IgG: 18,4%, IgG/IgG₄: 22,4%, sequentielle Inkubation: 8,2%) und auf dem Urothel (IgG: 8,2%, IgG/IgG₄: 4,1%, sequentielle Inkubation: 4,1%).

3.2 Auftreten und Verteilung von auf Anti-Desmocollin-Antikörper positiv

getesteten Seren

Von insgesamt 799 analysierten Seren der prospektiven Studie und Blutspender zeigten 19 (2,4%) Reaktivität gegen Desmocolline, wobei das Serum *Bern 006* positiv auf Dsc1 und Dsc3 reagierte (siehe Tab. 3.2). Das Alter der positiv getesteten Patienten variierte zwischen 23 und 94 Jahre ($58,21 \pm 22,2$), zehn waren weiblich, neun männlich. Mit Ausnahme von zwei (IgA-Reaktivität) zeigten alle Seren IgG-Reaktivität. 15 Seren (inklusive *Bern 006*) wiesen Dsc1-Reaktivität auf, wobei diese folgende mittels BIOCHIP™-Mosaik erhobene Diagnosen aufzeigten: vier Seren hatten die Diagnose Pemphigus vulgaris, drei Pemphigus foliaceus, zwei paraneoplastischen Pemphigus, drei bullöses Pemphigoid, eines hatte ein desmosomales interzelluläres Fluoreszenzmuster und ausschließlich Antikörper gegen Dsc1 (Diagnose: atypischer Pemphigus) und eines Blasenbodenfluoreszenz ohne finale Diagnose wegen fehlender Zielantigene auf dem Mosaik. Zusätzlich zeigte ein Blutspenderserum auch in der Nachtestung Dsc1-Reaktivität im IgA. Acht der 15 Dsc1-positiven Seren zeigten Reaktivität auf den Aceton- und den Formalin-fixierten Zellen, zwei nur auf den Aceton- und fünf lediglich auf den Formalin-fixierten Zellen. Das Serum *Sofia 081* mit Diagnose paraneoplastischer Pemphigus reagierte auf den Formalin-fixierten, Dsc2 exprimierenden Zellen positiv. Vier Seren von Patienten mit Pemphigus vulgaris (inklusive *Bern 006*) wiesen Reaktivität gegen Dsc3 auf, eines auf den Aceton- und Formalin-fixierten Zellen, eines nur auf den Aceton- und zwei ausschließlich auf den Formalin-fixierten Zellen.

Der Anteil von Anti-Dsc-Antikörper-positiven an allen von den jeweiligen Kooperationszentren eingesendeten Seren lag bei der Mehrheit zwischen 1,2 und 4 Prozent. Ausnahmen bildeten China (Peking) mit 8,6 Prozent und Australien

(Sydney) mit 13,3 Prozent. Dabei lag das Verhältnis von Pemphigus- zu Pemphigoidseren bei allen Zentren bis auf Deutschland (Lübeck) mit 0,1 und der Schweiz (Bern) mit 0,2 zwischen 0,6 und 2,3. Auch speziell bei den 14 Anti-Dsc-Antikörper-positiven Pemphigusseren lag der Anteil an den jeweils insgesamt eingesendeten Pemphigusseren (neben dem Zentrum Bern mit 16,7 Prozent) bei Sydney mit 22,2 Prozent und Peking mit 16,7 Prozent deutlich über den restlichen Zentren (2,6% bis 5,2%).

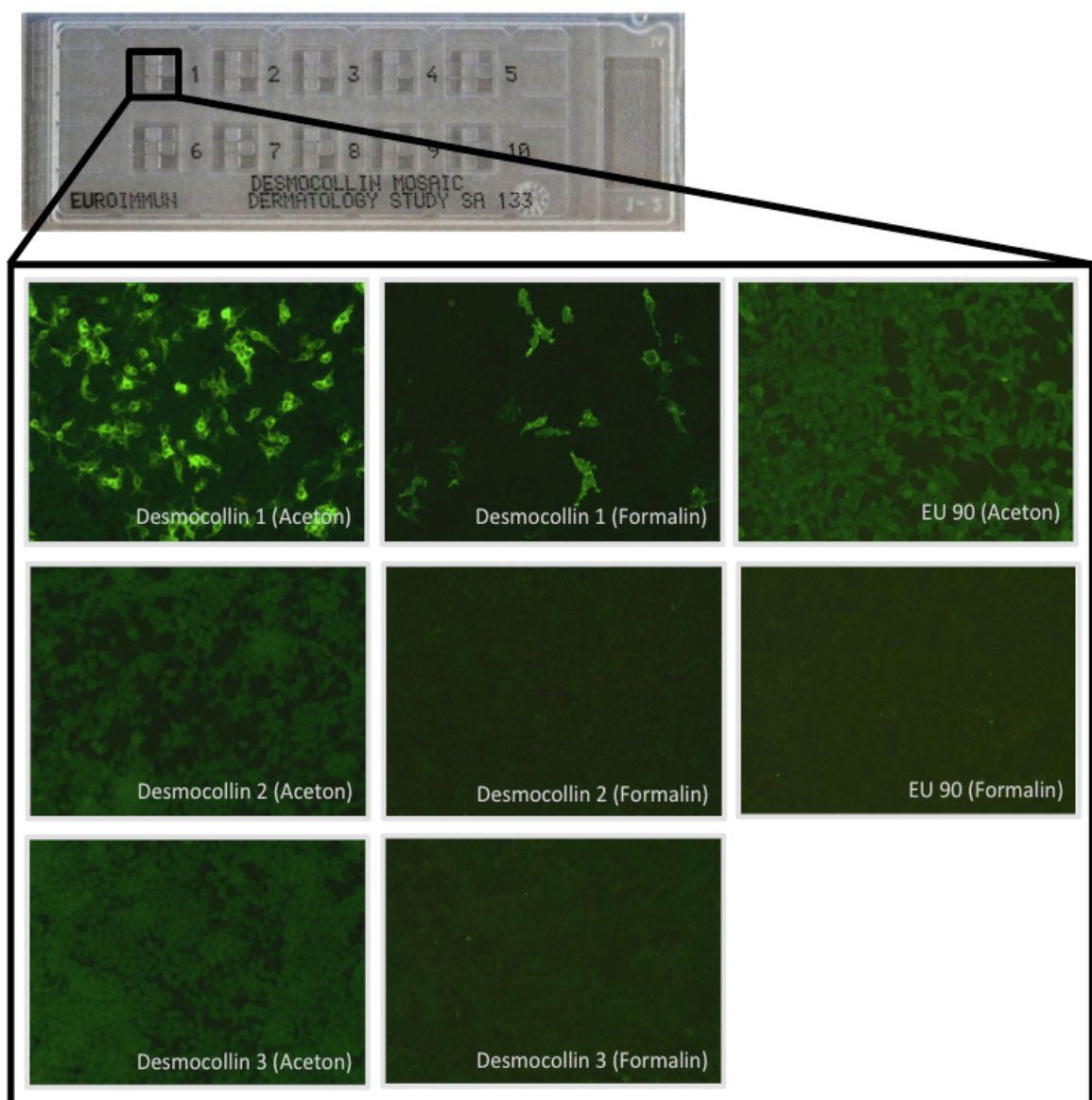


Abb. 3.8: Immunfluoreszenzmuster eines Patienten mit Autoantikörpern gegen Desmocollin 1 (*Sofia 018, 1:10, IgG/IgG₄, PBS-T*): Eine positive Immunfluoreszenz ist sowohl auf den Aceton- als auch Formalin-fixierten Zellen zu sehen. Alle anderen Zellen zeigen keine Reaktivität.

Tab. 3.2 Daten der Anti-Desmocollin-Antikörper-positiven Seren

Probennummer	Alter (Jahre)	Ge- schlecht	Diagnose DIF	Diagnose BIOCHIP™- Mosaik	Anti-Desmocollin Reaktivität (Titer)						AK Isotyp
					1 Aceton	1 Formalin	2 Aceton	2 Formalin	3 Aceton	3 Formalin	
<i>Belgrad 031</i>	40	w	PV	PV	-	-	-	-	320	100	IgG
<i>Bern 006</i>	82	m	Pveg	PV	1000	100	-	-	32	-	IgG
<i>Sofia 003</i>	37	w	PV	PV	32	-	-	-	-	-	IgG
<i>Sofia 018</i>	40	w	PV	PV	1000	1000	-	-	-	-	IgG
<i>Sofia 019</i>	50	w	PV	PV	-	-	-	-	-	32	IgG
<i>Sofia 066</i>	77	w	Pveg	PV	-	-	-	-	-	100	IgG
<i>Sofia 081</i>	68	m	PV	PNP	-	-	-	100	-	-	IgG
<i>Sydney 020</i>	44	m	PV	AP	100	10	-	-	-	-	IgG
<i>Tel Aviv 027</i>	30	w	PV	PV	32	100	-	-	-	-	IgG
<i>Thessaloniki 007</i>	77	w	PF	PF	100	32	-	-	-	-	IgG
<i>Sydney 014</i>	68	m	PF	PF	320	320	-	-	-	-	IgG
<i>Peking 027</i>	47	m	PF	PF	-	10	-	-	-	-	IgG
<i>Peking 029</i>	51	w	PNP	PNP	-	10	-	-	-	-	IgG
<i>Peking 034</i>	32	m	PNP	PNP	-	10	-	-	-	-	IgG
<i>Tel Aviv 053</i>	83	w	BP	BP	-	100	-	-	-	-	IgG
<i>Tel Aviv 086</i>	94	w	BP	BP	10	100	-	-	-	-	IgG
<i>Lübeck 003</i>	90	m	BP	BP	10	32	-	-	-	-	IgA
<i>Lübeck 226</i>	73	m	p200	/	-	10	-	-	-	-	IgG
<i>BS 226</i>	23	m	/	/	100	-	-	-	-	-	IgA

Probennummer	Fluoreszenz Reaktivität auf Dermatologie-Mosaik (Titer)										AK Isotyp
	Ösophagus		Spalthaut		Urothel	Gallen- gänge	Zielantigen				
	ICR	BM	BD	BB			Dsg1	Dsg3	BP180	BP230	
<i>Belgrad 031</i>	320	-	-	-	-	-	10	320	-	-	IgG
<i>Bern 006</i>	100	-	-	-	-	-	320	320	-	-	IgG
<i>Sofia 003</i>	320	-	-	-	-	-	10	1000	-	-	IgG
<i>Sofia 018</i>	3200	-	-	-	-	-	3200	320	-	-	IgG
<i>Sofia 019</i>	1000	-	-	-	-	-	1000	3200	-	-	IgG
<i>Sofia 066</i>	320	-	-	-	-	-	-	1000	-	-	IgG
<i>Sofia 081</i>	10	-	-	-	1000	1000	-	10	-	-	IgG
<i>Sydney 020</i>	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	IgG
<i>Tel Aviv 027</i>	100	-	-	-	-	-	-	100	-	-	IgG
<i>Thessaloniki 007</i>	100	-	-	-	-	-	320	-	-	-	IgG
<i>Sydney 014</i>	320	-	-	-	-	-	3200	-	-	-	IgG
<i>Peking 027</i>	320	-	-	-	-	-	1000	-	-	-	IgG
<i>Peking 029</i>	320	-	-	-	1000	-	100	100	-	-	IgG
<i>Peking 034</i>	1000	-	-	-	1000	-	10	1000	-	-	IgG
<i>Tel Aviv 053</i>	-	320	320	-	-	-	-	-	320	320	IgG
<i>Tel Aviv 086</i>	-	10	100	100	-	-	-	-	10	-	IgG
<i>Lübeck 003</i>	-	10	100	-	-	-	-	-	320	-	IgG
<i>Lübeck 226</i>	-	10	-	100	-	-	-	-	-	-	IgG
<i>BS 226</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DIF: direkte Immunfluoreszenz, AK: Antikörper, PV: Pemphigus vulgaris, PF: Pemphigus foliaceus, PNP: paraneoplastischer Pemphigus, Pveg: Pemphigus vegetans, AP: atypischer Pemphigus, BP: bullöses Pemphigoid, p200: Anti-Laminin γ 1/p200 Pemphigoid, ICR: Interzellularraum, BM: Basalmembran, BD: Blasendach, BB: Blasenboden, Dsg: Desmoglein.

3.3 Leistungsfähigkeit des Absorptionspuffers

3.3.1 Einfluss des Absorptionspuffers auf unspezifische desmosomale Fluoreszenzreaktionen

465 der 799 inkubierten Seren waren Pemphigoid- bzw. Blutspenderseren und somit war das Auftreten unspezifischer desmosomaler Fluoreszenzreaktionen hier möglich (ausgeschlossen vier Seren, die laut DIF Pemphigus, mittels BIOCHIP™-Technologie aber nicht diagnostizierbar waren, siehe Kapitel 3.1.2). 132 (28%) der 465 Seren zeigten derartige Reaktionen, aufgeteilt in 88 (21%) der 416 Patientenproben mit Pemphigoiderkrankungen (eingeschlossen ein Serum mit Diagnose Dermatitis herpetiformis) und 44 (90%) der 49 Blutspenderproben (ausgeschlossen ein Blutspenderserum, bei welchem Anti-Dsg3-Antikörper nachgewiesen wurden, siehe Kapitel 3.1.3). Bei Betrachtung der einzelnen Inkubationen traten bei Inkubation mit PBS und IgA-Konjugat 18 unspezifische desmosomale Reaktionen auf, bei Inkubation mit IgG-Konjugat 60, im IgG/IgG₄-Gemisch 49 und in der sequentiellen Inkubation 123. In allen Inkubationen fand bei Inkubation mit Absorptionspuffer eine statistisch signifikante Reduktion der unspezifischen desmosomalen Signale statt (siehe Abb. 3.9). Bei Detektion von IgA-Reaktivität betrug die relative Reduktion der unspezifischen Signale 55,5% ($p = 0,001$), bei IgG-Reaktivität 35% ($p = 0,00049$), beim IgG/IgG₄-Gemisch 55,1% ($p = 7,4 \times 10^{-8}$) und in der sequentiellen Inkubation 17,1% ($p = 0,001$).

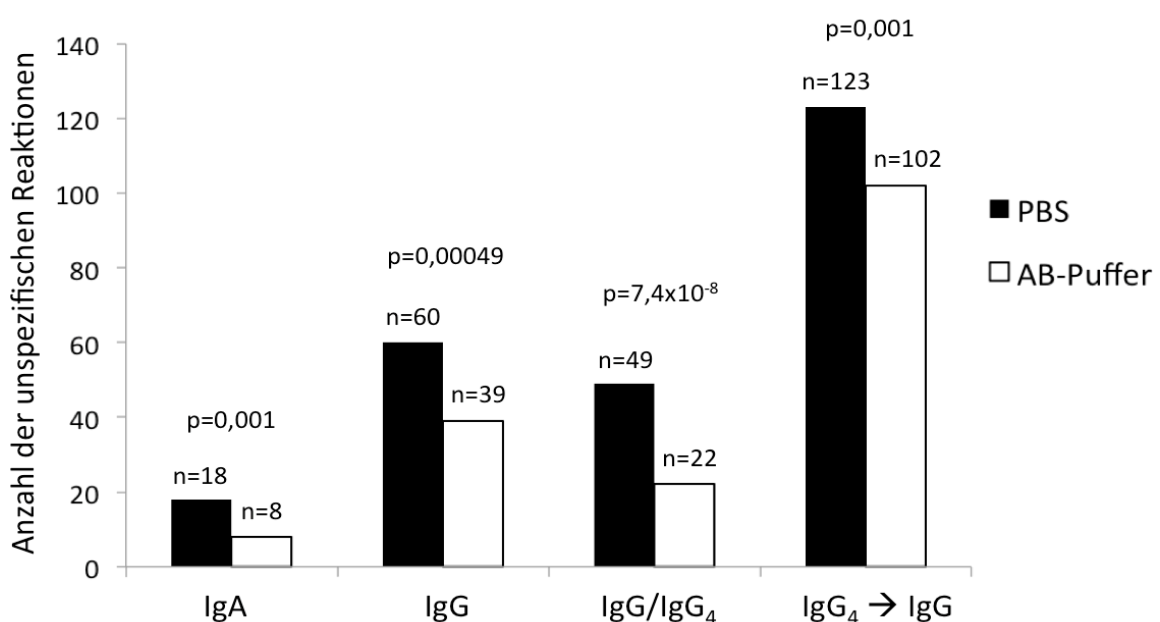


Abb. 3.9: Auftreten und Verteilung von unspezifischen desmosomalen Fluoreszenzreaktionen bei Inkubation mit PBS (schwarz) und Absorptionspuffer (AB-Puffer, weiß).

3.3.2 Einfluss des Absorptionspuffers auf diagnosespezifische Fluoreszenzsignale

Bei der Inkubation mit Absorptionspuffer konnten bei allen aus der Studienkohorte ausgewählten Kontrollseren von 50 Patienten mit bullösem Pemphigoid und 50 mit Pemphigus vulgaris (siehe Kapitel 2.3.3) zur Testung möglicher Unterschiede in den Fluoreszenzsignalen die korrekte Diagnose durch vorhandene Immunfluoreszenzen erhoben werden. Die Testung der Blutspenderseren als Negativkontrollen (siehe Kapitel 3.1.3) zeigte keine Herabsetzung der Spezifität durch Inkubation mit Absorptionspuffer. Die Auswertung des Puffereinflusses auf die Stärke der Fluoreszenzen wurde anhand der IgG-Inkubationen vorgenommen, da in dem vorhandenen Krankheitsspektrum der Studienseren zu wenig relevante IgA-Reaktionen für aussagekräftige Testungen auftraten. Dabei war der für die Fluoreszenzstärke durchschnittlich vergebene Titer auf alle Inkubationen gemittelt bei PBS-Inkubationen um den Faktor 1,18 höher als bei Inkubationen mit Absorptionspuffer (Faktor 1,0 ist gleichbedeutend mit identischen gemittelten Titern in beiden Inkubationen). Die Spannweite der Faktoren lag zwischen 1,05 bei Geweben in der sequentiellen Inkubation und 1,44 bei EUROPLUS®-Chips im IgG (siehe Tab. 3.3). Die Anzahl der betrachteten Signale pro Inkubation und

Tab. 3.3 Einfluss des Absorptionspuffers (AB-Puffer) auf die Höhe des Titers (logarithmiert) bei verschiedenen Inkubationen und BIOCHIP™-Typen

Inkubation	BIOCHIP™ Typ	Anzahl möglicher Signale	Mittelwerte logarithmischer Titerstufen				p-Wert
			PBS	AB-Puffer	Differenz	Faktor PBS/ AB-Puffer	
IgG	Gewebe	175	4,919	4,338	0,581	1,134	0,003
	Zellen	109	6,015	4,819	1,196	1,248	<0,001
	EUROPLUS®	61	4,834	3,361	1,473	1,438	0,001
	Gesamt	345	5,251	4,318	0,933	1,216	<0,001
IgG/IgG ₄	Gewebe	191	5,381	5,023	0,358	1,071	0,061
	Zellen	110	6,244	4,903	1,341	1,274	<0,001
	EUROPLUS®	60	4,973	3,744	1,229	1,328	0,011
	Gesamt	361	5,576	4,774	0,802	1,168	<0,001
IgG ₄ -> IgG	Gewebe	184	5,529	5,258	0,271	1,052	0,077
	Zellen	106	6,174	5,001	1,173	1,235	<0,001
	EUROPLUS®	56	4,628	3,351	1,277	1,381	0,001
	Gesamt	346	5,581	4,871	0,71	1,146	<0,001

BIOCHIP™-Typ betrug im Durchschnitt 116,89 (Minimum 56 bei EUROPLUS®-Chips in der sequentiellen Inkubation, Maximum 191 bei Geweben im IgG/IgG₄-Gemisch). Dabei lagen die p-Werte von sieben der neun betrachteten Subklassen unter dem Signifikanzniveau von $p=0,05$ und waren somit statistisch signifikant. Die gemittelte Titererhöhung bei Geweben in PBS und IgG/IgG₄-Gemisch um den Faktor 1,07 und die bei Geweben in der sequentiellen Inkubation mit PBS um den Faktor 1,05 wiesen mit einem p-Wert von 0,061 und 0,077 keine statistische Signifikanz auf. Bei Betrachtung der gesamten Signale pro Konjugattyp lag bei allen Inkubationen eine hochsignifikante Titererhöhung bei Inkubation mit PBS im Vergleich zur Inkubation mit Absorptionspuffer vor: im IgG um den Faktor 1,22, im IgG/IgG₄-Gemisch um den Faktor 1,17 und in der sequentiellen Inkubation um den Faktor 1,15.

3.4 Ergebnisse zum Einfluss von Inkubation mit IgG₄-Konjugaten auf

Diagnosestellung und Ablesequalität

Bei Auswertung der Inkubationen mit IgG₄-Konjugaten wurden zum einen Signale betrachtet, die sich ausschließlich in bestimmten IgG-Konjugaten zeigten, zum anderen Diagnosen, die ausschließlich durch Verwendung von IgG₄-Konjugaten ermittelt werden konnten und schließlich eine mögliche Titererhöhung oder -absenkung bei Inkubation mit IgG₄-Konjugaten im Vergleich zum IgG, die zur Veränderung der Ablesequalität führen könnte. Unspezifische desmosomale Signale wurden aufgrund des großen Anteils an den betrachteten Reaktionen (siehe Kapitel 3.3.1) vorher ausgefiltert, andere unspezifische Gewebereaktionen

Tab. 3.4 Verteilung der ausschließlich in einzelnen Inkubationen (IgG-Konjugate) auftretenden Fluoreszenzsignale bezogen auf die Gesamtanzahl der betrachteten Signale bei verschiedenen BIOCHIP™-Typen

Signale	IgG vs. IgG/IgG ₄			IgG/IgG ₄ vs. IgG ₄ -> IgG		
	Absolut	IgG (%)	IgG/IgG ₄ (%)	Absolut	IgG/IgG ₄ (%)	IgG ₄ -> IgG (%)
Gewebe	1378	25 (1,8%)	142 (10,3%)	1463	176 (12,0%)	109 (7,5%)
Zellen	622	2 (0,3%)	13 (2,1%)	626	38 (6,1%)	6 (0,9%)
EUROPLUS®	430	11 (2,6%)	11 (2,6%)	424	69 (16,3%)	5 (1,2%)

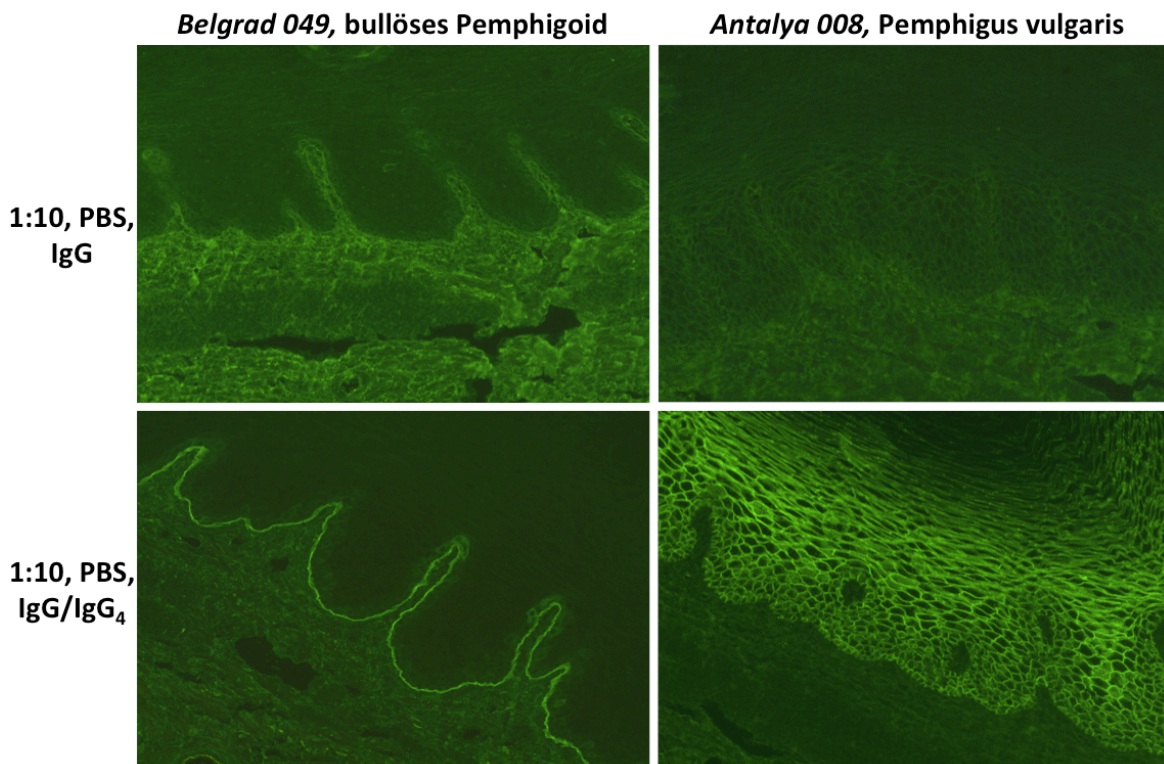


Abb. 3.10: Vergleich der basal gelegenen linearen und interzellulären Immunfluoreszenzen zweier Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid und Pemphigus vulgaris bei Inkubation mit IgG- und IgG/IgG₄-Konjugat auf Ösophagus.

sowie unspezifische Signale des Gliadin-GAF3x wurden aufgrund des geringen Anteils unter fünf Prozent nicht gesondert aus der Berechnung eliminiert.

Im Vergleich zur Inkubation mit IgG-Konjugat konnten 10,3 Prozent der insgesamt 1378 betrachteten Gewebesignale ausschließlich im IgG/IgG₄-Gemisch gefunden werden sowie 2,1 Prozent der 622 betrachteten Fluoreszenzreaktionen der Zellen (bei Inkubation mit IgG-Konjugat bei Geweben 1,8% und Zellen 0,3%, siehe Tab. 3.4). Bei den 430 betrachteten EUROPLUS[®]-Reaktionen zeigten jeweils 2,6 Prozent ausschließlich bei Inkubation mit IgG bzw. Gemisch Fluoreszenzsignale. Im Vergleich zwischen IgG/IgG₄-Gemisch und sequentieller Inkubation wurden bei Gewebe, Zellen und EUROPLUS[®] jeweils mehr Fluoreszenzsignale über Inkubation mit dem Gemisch in folgendem Verhältnis detektiert: 12 zu 7,5 Prozent bei 1463 betrachteten Gewebereaktionen, 6,1 zu 0,9 Prozent bei 626 betrachteten Zellreaktionen und 16,3 zu 1,2 Prozent bei 424 EUROPLUS[®]-Signalen. In Bezug auf die Testung der Studiengruppe konnten sieben (0,9%) der 750 erhobenen Diagnosen nur durch Verwendung von IgG₄ (in allen Fällen durch das Gemisch) ermittelt werden. Drei Seren wurden im IgG als Pemphigus foliaceus diagnostiziert und im Gemisch durch zusätzliche Anti-Dsg3-Reaktivität als Pemphigus vulgaris

gewertet. Die vier weiteren wiesen in der Inkubation mit IgG keine Fluoreszenzreaktionen auf, während im Gemisch zwei Seren Anti-Dsg1-Reaktivität zeigten (Diagnose Pemphigus foliaceus), ein Serum Reaktivität gegen Dsc1 aufwies (Diagnose atypischer Pemphigus) und ein Serum für bullöses Pemphigoid typische Signale auf Geweben und Anti-BP180-Reaktivität zeigte. Bei sechs (0,8%) weiteren Seren konnte die im IgG durch vorhandene Immunfluoreszenzmuster an der Basalmembran und am Blasendach gestellte Verdachtsdiagnose bullöses Pemphigoid durch zusätzliche Reaktionen der Zielantigene im IgG/IgG₄-Gemisch erhärtet werden. Damit konnten mit dem IgG/IgG₄-Gemisch die meisten Reaktionen detektiert werden.

Bei Betrachtung der möglichen Titerveränderungen durch das IgG/IgG₄-Gemisch zeigten 12 der 14 ausgewerteten Fluoreszenzmuster auf dem Mosaik eine Erhöhung des jeweils durchschnittlich vergebenen Titers um einen Faktor zwischen 1,03 und 1,56 bei Inkubation mit dem Gemisch im Vergleich zur Inkubation mit IgG-Konjugat (bei zwischen vier und 416 betrachteten Fällen, siehe Tab. 3.5). Statistisch signifikant waren hier vor allem die Titererhöhungen bei den interzellulären und basal linearen Fluoreszenzen auf dem Ösophagus sowie solche im Bereich des Blasendachs auf der Spalthaut, welche eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzstärke auf den Geweben zeigen (siehe auch Abb. 3.10). Nicht signifikante Erniedrigungen des Titers bei Inkubation mit Gemisch zeigte das Kollagen Typ VII in insgesamt vier Fällen und Gliadin-GAF3x, dessen 72 betrachtete Signale bis auf ein als Dermatitis herpetiformis gewertetes Serum unspezifisch waren. Auch die Gesamtbetrachtung der Gewebe zeigte eine hochsignifikante Titererhöhung um den Faktor 1,19 bei 1378 betrachteten Signalen, während die Zellen eine statistisch signifikante Erhöhung um den Faktor 1,05 und die EUROPLUS®-Chips keine signifikante Titererhöhung aufwiesen. Bei Betrachtung aller 2430 Fluoreszenzsignale des Mosaiks wurde eine statistisch signifikante Erhöhung des durchschnittlich vergebenen Titers um den Faktor 1,12 ermittelt. Im Vergleich zwischen IgG/IgG₄-Gemisch und sequentieller Inkubation zeigten neun der 14 betrachteten Fluoreszenzmuster eine Titererhöhung bei Inkubation mit dem Gemisch um Faktoren zwischen 1,06 und 2,44 bei einer Anzahl von drei bis 412 betrachteten Signalen (sechs davon signifikant, siehe Tab. 3.6).

Fünf Kategorien zeigten durchschnittlich höhere Titer bei sequentieller Inkubation (eines signifikant). Bei den BIOCHIP™-Typen (Gewebe, Zellen, EUROPLUS®) wiesen alle eine Titererhöhung bei dem IgG/IgG₄-Gemisch auf, welche bei den Zellen und EUROPLUS®-Chips mit einem Faktor von 1,07 und 1,25 bei 626 bzw. 424 Signalen statistische Signifikanz zeigte. Auch der im Durchschnitt für alle 2513 betrachteten Immunfluoreszenzreaktionen des Mosaiks vergebene Titer wies bei dem Gemisch im Vergleich zu der sequentiellen Inkubation mit einem Faktor von 1,08 eine hochsignifikante Anhebung auf.

Tab. 3.5 Einfluss des IgG/IgG₄-Gemisches auf die Höhe des Titers (logarithmiert) bei den Immunfluoreszenzen verschiedener BIOCHIP™-Typen im Vergleich zum IgG-Konjugat

BIOCHIP™	Anzahl möglicher Signale	Mittelwerte logarithmischer Titerstufen				p-Wert
		IgG	IgG/IgG ₄	Differenz (IgG/IgG ₄) - IgG	Faktor (IgG/IgG ₄) / IgG	
Öso Desmosomen	324	5,274	5,971	0,697	1,132	<0,001
Öso BM	301	3,376	4,876	1,5	1,445	<0,001
Spalthaut BD	416	4,694	5,237	0,543	1,116	<0,001
Spalthaut BB	44	2,853	3,194	0,341	1,119	0,407
Urothel	34	3,117	3,456	0,339	1,109	0,586
Blase BM	243	4,219	4,968	0,749	1,177	<0,001
Leber Serosa	7	2,632	2,798	0,166	1,063	0,892
Leber Gallengänge	9	2,946	4,608	1,662	1,564	0,115
Dsg1	261	4,901	5,086	0,185	1,038	0,278
Dsg3	260	6,213	6,479	0,266	1,043	0,017
BP230	97	4,989	5,523	0,534	1,107	0,043
Kollagen Typ VII	4	4,326	3,751	-0,575	0,867	0,877
BP180-NC16A-4X	358	4,944	5,069	0,125	1,025	0,436
Gliadin-GAF3x	72	3,344	3,279	-0,065	0,981	0,961

BIOCHIP™-Typ zusammengefasst

Gewebe	1378	4,339	5,158	0,819	1,189	<0,001
Zellen	622	5,459	5,728	0,269	1,049	0,011
EUROPLUS®	430	4,676	4,769	0,093	1,021	0,471
Gesamt	2430	4,685	5,235	0,55	1,117	<0,001

Öso: Ösophagus, BM: Basalmembran, BD: Blasendach, BB: Blasenboden, Dsg: Desmoglein.

Tab. 3.6 Einfluss des IgG/IgG₄-Gemisches auf die Höhe des Titters (logarithmiert) bei den Immunfluoreszenzen verschiedener BIOCHIP™-Typen im Vergleich zur sequentiellen Inkubation

BIOCHIP™	Anzahl möglicher Signale	Mittelwerte logarithmischer Titerstufen				p-Wert
		IgG/IgG ₄	IgG -> IgG ₄	Differenz IgG/IgG ₄ - (IgG -> IgG ₄)	Faktor (IgG/IgG ₄) / (IgG -> IgG ₄)	
Öso Desmosomen	335	5,775	5,968	-0,193	0,968	0,359
Öso BM	319	4,609	4,302	0,307	1,071	0,138
Spalthaut BD	412	5,287	4,647	0,640	1,138	0,002
Spalthaut BB	46	3,055	1,803	1,252	1,694	0,002
Urothel	48	2,448	2,738	-0,290	0,894	0,367
Blase BM	276	4,374	4,374	0,000	1,000	0,822
Leber Serosa	17	1,152	3,186	-2,034	0,362	0,008
Leber Gallengänge	10	4,147	3,109	1,038	1,334	0,459
Dsg1	262	5,067	4,424	0,643	1,145	0,001
Dsg3	261	6,455	6,079	0,376	1,062	0,032
BP230	100	5,357	5,669	-0,312	0,945	0,084
Kollagen Typ VII	3	5,001	3,071	1,930	1,628	0,261
BP180-NC16A-4X	359	5,055	4,313	0,742	1,172	<0,001
Gliadin-GAF3x	65	3,633	1,489	2,144	2,440	<0,001
BIOCHIP™-Typ zusammengefasst						
Gewebe	1463	4,859	4,643	0,216	1,047	0,061
Zellen	626	5,691	5,307	0,384	1,072	0,008
EUROPLUS®	424	4,837	3,88	0,957	1,247	<0,001
Gesamt	2513	5,063	4,679	0,384	1,082	<0,001

Öso: Ösophagus, BM: Basalmembran, BD: Blasendach, BB: Blasenboden, Dsg: Desmoglein.

4 Diskussion

Das BIOCHIP™-Mosaik bietet die Möglichkeit, über IIF durch Kombination von winzigen (2x2mm) Gewebeschnitten und spezifischen Zielantigenen verschiedene bullöse Autoimmundermatosen in einer Einschrittmethodik zu diagnostizieren [154, 193, 194]. Nach der Einführung dieser Technologie in die Diagnostik bullöser Autoimmundermatosen 2012 [17] konnte bereits in mehreren kleineren Studien unter Verwendung eines BIOCHIP™-Mosaiks mit sechs Substraten für bullöses Pemphigoid und Pemphigus vulgaris die hohe diagnostische Übereinstimmung dieses neuen Verfahrens mit der etablierten Mehrschrittdiagnostik sowie die einfache Handhabbarkeit der BIOCHIP™-Technologie gezeigt werden [51, 164, 197, 211].

Für die nun in dieser Arbeit beschriebene Studie wurde die bisher weltweit größte prospektiv gesammelte Kohorte an Seren von DIF-positiven Patienten mit bullösen Autoimmundermatosen verwendet. Ziel der vorliegenden Studie war der Vergleich der Leistungsfähigkeit eines größeren BIOCHIP™-Mosaiks zur Diagnostik von auch selteneren Autoimmundermatosen wie der Epidermolysis bullosa acquisita oder Dermatitis herpetiformis in der Einschrittmethode mit der etablierten Mehrschrittdiagnostik. Zusätzlich erfolgte die Analyse des Auftretens und der Assoziation von Autoantikörpern gegen Desmocolline mit verschiedenen bullösen Autoimmundermatosen. Des Weiteren sollte hier eine mögliche Verbesserung der Ablesequalität durch den Einsatz eines Absorptionspuffers zur Eliminierung von unspezifischen desmosomalen Fluoreszenzreaktionen einerseits und die zusätzliche Inkubation mit speziellen IgG₄-Konjugaten zur Steigerung von spezifischen Fluoreszenzsignalen andererseits geprüft werden. Zum Einsatz kamen zwei verschiedene BIOCHIP™-Mosaik, ein Mosaik zur Detektion von Autoantikörpern gegen Desmocollin 1, 2 und 3 und ein größeres Mosaik mit 12 Substraten, das alle bisher entwickelten Substrate zur Diagnose bullöser Autoimmundermatosen umfasst.

Auch diese Studie zeigt einen hohen Anteil an durch das BIOCHIP™-Mosaik ermittelten Diagnosen (94,8 Prozent der 750 Studienserendiagnosen). Ähnliche Zahlen zeigten van Beek und Kollegen 2012 in einer prospektiven Studie mit 454

Seren. Hier konnten 93,6 Prozent der Diagnosen mithilfe des kleinen BIOCHIP™-Mosaiks mit sechs BIOCHIPs™ ermittelt werden [17]. Eine ebenfalls hohe Übereinstimmung der damaligen Studie mit dieser zeigt sich in dem Vergleich der jeweils mittels BIOCHIP™- und Mehrschritt Diagnostik erhobenen Diagnosen von Pemphigus vulgaris, Pemphigus foliaceus und bullösem Pemphigoid. Van Beek und Kollegen erzielten jeweils Cohens Kappa Werte von 0,91, 0,88 und 0,97 [17]. Die aktuelle prospektive randomisierte Studie erreichte ein Cohens Kappa zwischen 0,84 und 1,00 (ausgenommen Erkrankungen, die durch fehlende Zielantigene nicht auf dem Mosaik vertreten waren), welches für Pemphigus vulgaris, Pemphigus foliaceus und bullöses Pemphigoid bei 0,93, 0,84 und 0,98 lag. Als Grund für die hohe erreichte Übereinstimmung der Daten der BIOCHIP™-Technologie mit denen der etablierten Mehrschritt Diagnostik ist die ähnliche Methodik anzusehen. Bei beiden Verfahren nimmt die IIF eine wichtige Rolle ein, indem sie durch entsprechende Gewebereaktionen über die Krankheitsentität Aufschluss gibt. Die serologische Diagnostik beginnt in der etablierten Mehrschritt Diagnostik mit der IIF auf Affenösophagus und Spalthaut und ist bei der BIOCHIP™-Technologie in das Mosaik integriert [17, 178].

Auch gemessen an den Ergebnissen der DIF konnte durch das 12er-BIOCHIP™-Mosaik eine hohe Anzahl an Diagnosen ermittelt werden (329 der 333 Pemphigus- und 402 der 416 Pemphigoiddiagnosen). Im Bereich der Pemphigus-erkrankungen war die BIOCHIP™-Technologie hier sogar der etablierten Mehrschritt Diagnostik überlegen (Gründe dafür siehe 4.1). Mit 96 Prozent erzielte das 12er-Mosaik auch bei den negativen Blutspenderkontrollen einen hohen Anteil richtig getesteter Seren. Diese Daten zeigen übereinstimmend zu vorherigen Studien, dass die BIOCHIP™-Technologie gerade für den überwiegenden Anteil an Diagnosen von bullösem Pemphigoid, Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus unter den bullösen Autoimmundermatosen (in dieser Studie 92,8% der Diagnosen) eine zur etablierten Mehrschritt Diagnostik vergleichbar gute, effiziente und schnellere Diagnostikmöglichkeit darstellt [17, 51, 164, 197, 211].

Interessanterweise befanden sich unter den Seren mit der Diagnose eines bullösen Pemphigoids bei van Beek und Kollegen ausschließlich solche mit Reaktivität gegen BP180 - alleine oder zusätzlich zu BP230 -, sodass die Relevanz der BP230 exprimierenden HEK293-Zellen auf dem Mosaik für die

Diagnostik von bullösem Pemphigoid nicht beurteilt werden konnte [17]. Auch andere Literatur weist auf die unklare Bedeutung von Antikörpern gegen BP230 in der Pathogenese von bullösem Pemphigoid hin [179]. Unter den in dieser Studie mittels BIOCHIP™-Technologie diagnostizierten 371 Seren mit bullösem Pemphigoid zeigte ein geringer Anteil von 3 Seren ausschließlich Reaktivität gegen BP230, bei dem die mit diesem Antigen transfizierten Zellen entscheidend für die Diagnosestellung waren. Dennoch konnten über 99 Prozent der Diagnosen anhand des BP180 EUROPLUS® gestellt werden, dem eine deutlich höhere Relevanz zukommt. Somit war der Anteil von Seren, bei denen der Nachweis von Autoantikörpern gegen BP230 einen diagnoserelevanten Nutzen hatte, vergleichsweise niedriger als in Arbeiten von Charneux und Kollegen und Roussel und Kollegen in 2011 und Blöcker und Kollegen in 2012, die die Steigerung der Sensitivität bei der Diagnostik des bullösen Pemphigoids durch den zusätzlichen Einsatz von BP230-ELISA-Testsystemen im Vergleich zur ausschließlichen Verwendung des BP180-ELISAs mit 5%, 8% und 4,2% beschrieben [28, 37, 163].

4.1 Das Potential des 12er-BIOCHIP™-Mosaiks in der Diagnostik seltenerer bullöser Autoimmundermatosen

In ihrer prospektiven Studie zum diagnostischen Vergleich der BIOCHIP™- mit der konventionellen Technologie beschrieben van Beek und Kollegen 2012 einen kleinen Anteil von Seren (fünf Fälle von Anti-Laminin γ 1/p200 Pemphigoid, drei mit Anti-Laminin 332-Schleimhautpemphigoid und jeweils zwei Fälle von paraneoplastischem Pemphigus und Dermatitis herpetiformis), die alle aufgrund von fehlenden antigenspezifischen BIOCHIPs™ nicht diagnostiziert werden konnten [17]. Das in dieser Studie verwendete 12er-Mosaik erlaubte die zusätzliche Diagnostik von paraneoplastischem Pemphigus, Epidermolysis bullosa acquisita und Dermatitis herpetiformis, die durch die zusätzlichen BIOCHIPs™ mit Leber und einem Gliadin-GAF3x EUROPLUS®, Harnblase mit Urothel und Leber mit Serosa und einem mit Kollagen Typ VII exprimierenden Zellen versehenen BIOCHIP™ ermöglicht wurde [85, 90, 111, 154].

Tatsächlich konnten so ein Fall von Dermatitis herpetiformis, vier von paraneoplastischem Pemphigus und vier Fälle von Epidermolysis bullosa acquisita mit Cohens Kappa Werten von 1,00, 1,00 und 0,86 im Vergleich zur Mehrschritt Diagnostik detektiert werden. Während bei Dermatitis herpetiformis vor allem die Kombination aus Endomysiumreaktion und positivem Gliadin-GAF3x EUROPLUS® entscheidend zu der spezifischen Diagnose des einen Falls beitrug, war für die Diagnose paraneoplastischer Pemphigus in allen Fällen die Reaktion der Harnblase zusätzlich zur Dsg3-Reaktivität relevant. Die Reaktivität gegen Serosa bei nur einem Fall war vernachlässigbar und erwies sich in dieser Studie nicht als diagnostischer Nutzen. Durch die anderen neuen BIOCHIPs™ dagegen (insbesondere Endomysium auf Leber und Gliadin, Harnblase und Kollagen Typ VII), die drei sehr seltene bullöse Autoimmundermatosen betrachten [22, 23, 206, 219], konnte ein zusätzlicher Anteil von 1,2 Prozent von Diagnosen gestellt und ein Vorteil in der Diagnostik von bullösen Autoimmundermatosen mittels BIOCHIP™-Technologie erzielt werden.

Zur weiteren Steigerung der Leistungsfähigkeit des Mosaiks in der Diagnostik von paraneoplastischem Pemphigus wäre die direkte Präsentation von Zielantigenen aus der Plakin-Familie, insbesondere Envo- und Periplakin, über humane Keratinozyten eine Möglichkeit [10, 101, 153]. In Studien von Probst und Kollegen 2009 konnte bereits die hohe Sensitivität und Spezifität von ELISA-Testsystemen unter Verwendung von rekombinanten Fragmenten von Envoplakin und Periplakin mit einer Sensitivität von 74,2 - 80,6% und Spezifität von 96,3 – 98,8% gezeigt werden [153]. Es ist zu beachten, dass der sehr geringe Anteil dieser speziellen Diagnosen an den Studienserien wenig statistische Aussagen über die BIOCHIPs™ zulässt und weitere Testungen mit größeren Kohorten speziell zu diesen Krankheitsentitäten hilfreich wären.

Obwohl anhand der Gewebereaktionen auf dem Ösophagus und der humanen Spalthaut eine erste Einteilung der Erkrankungen vorgenommen wurde, konnten 21 Fälle mit Blasenbodenreaktivität in der humanen Spalthaut nicht weiter diagnostiziert werden. Des Weiteren konnte bei 24 Fällen durch Blasendachreaktivität der Verdacht auf bullöses Pemphigoid geäußert, allerdings nicht durch entsprechende Zielantigene bestätigt werden. Knapp ein Viertel der 21 Seren mit Blasenbodenreaktivität in der Spalthaut führten in der etablierten

Mehrschrittdiagnostik durch Nachweis von Antikörpern gegen Laminin 332 zur Diagnose eines Schleimhautpemphigoids. Laminin 332 ist bei ca. 20% der Patienten mit Schleimhautpemphigoid das Zielantigen [59, 107, 179]. Dem Nachweis von Antikörpern gegen Laminin 332 kommt eine besondere Bedeutung zu, da bei 25 – 30% der Patienten mit Schleimhautpemphigoid und Autoantikörpern gegen Laminin 332 das gleichzeitige Auftreten einer malignen Erkrankung beschrieben wurde [61, 74, 124]. Für den Nachweis dieser Antikörper, der bisher nur in spezialisierten Zentren mittels Immunoblots oder ELISA-Testsystemen möglich war, gibt es seit kurzem ein relatives sensitives (Sensitivität bis zu 80%) und sehr spezifisches, einfach umzusetzendes IIF-Verfahren, das mit Laminin 332 exprimierenden HEK293 Zellen arbeitet (Oberflächenpräsentation der $\alpha 3$ -, $\beta 3$ - und $\gamma 2$ -Kette) und mittlerweile auch in Form eines BIOCHIPs™ Anwendung findet [74].

Die anderen drei Viertel der 21 Seren mit Blasenbodenreaktivität in der Spalthaut mit insgesamt 17 Seren wurden in der Mehrschrittdiagnostik interessanterweise alle als Anti-Laminin $\gamma 1/p200$ Pemphigoid diagnostiziert. Erst kürzlich konnte in Studien die Bedeutung von Autoantikörpern gegen Laminin $\gamma 1/p200$ Protein und deren diagnostische Relevanz gezeigt werden [73, 78]. So wiesen in einer Studie von Goletz und Kollegen 2014 90% der Seren von Patienten mit Anti-p200 Pemphigoid Autoantikörper gegen Laminin $\gamma 1$ auf [73]. Da sowohl Seren ohne als auch mit Autoantikörpernachweis gegen Laminin $\gamma 1$ ex vivo in Hautschnitten zur subepidermalen Blasenbildung führten, konnte eine Rolle der Antikörper für die Pathogenese der Erkrankung nicht abschließend geklärt, der diagnostische Nutzen jedoch herausgestellt werden [73].

Der Anteil von Patientenseren mit Blasenbodenreaktivität in der humanen Spalthaut unter den gesamten Diagnosen betrug 2,8 Prozent. Dies stellte einen nicht unerheblichen Anteil der Pemphigoiderkrankungen in dieser Studie dar, welcher durch die fehlenden Zielantigene Laminin 332 und Laminin $\gamma 1/p200$ Protein auf dem Mosaik nicht mittels BIOCHIP™-Technologie diagnostiziert werden konnte. Insbesondere Laminin $\gamma 1/p200$ Protein könnte als Zielantigen auf dem Mosaik das Spektrum der zu diagnostizierenden Erkrankungen erweitern, die Anzahl nicht diagnostizierter bullöser Autoimmundermatosen deutlich senken und zu einer optimierten Diagnostikmethode beitragen.

Neben den oben beschriebenen 21 Fällen mit Reaktivität gegen Blasenboden auf humaner Spalthaut zeigten weitere sechs der 28 Seren, die nicht vollständig mittels BIOCHIP™-Technologie diagnostiziert werden konnten, keinerlei Immunfluoreszenz auf dem Mosaik, während in der Mehrschrittdiagnostik zwar ebenfalls keine IIF- oder ELISA-Reaktionen detektiert, dafür aber ein positives Ergebnis im IgG-LAD-1-Immunoblot gefunden wurde. Das 120 kDa große LAD-1-Antigen stellt die lösliche Ektodomäne von BP180 dar, ist somit maßgeblich an der Verankerung basaler Keratinozyten der Epidermis mit subepidermalen Strukturen beteiligt und wird aus dem Überstand kultivierter Keratinozyten gewonnen [135, 179, 214]. Es konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Patienten mit linearer IgA-Dermatose, der häufigsten Pemphigoiderkrankung des Kindes, aber auch Subgruppen von Patienten mit bullösem Pemphigoid und Schleimhautpemphigoid, Reaktivität gegen dieses Antigen aufweisen, was die Ähnlichkeit in der Pathogenese zwischen diesen Erkrankungen verdeutlicht [160, 179].

Auch in 22 der 24 Verdachtsfälle auf bullöses Pemphigoid in dieser Studie, die durch fehlende Zielantigenreaktivität auf dem BIOCHIP™-Mosaik charakterisiert waren, zeigte der ELISA in der Mehrschrittdiagnostik keine Ergebnisse für BP180-NC16A oder BP230; im LAD-1-Immunoblot fand sich jedoch IgG Reaktivität. Zwar wurde BP180-NC16A immer wieder mit einem Anteil von 80 bis 90 Prozent als das Hauptzielantigen des bullösen Pemphigoids beschrieben [71, 180], dennoch zeigen viele Studien die Präsenz von Autoantikörpern gegen andere teils nah an NC16A, teils intrazellulär gelegene Epitope von BP180 [52, 53, 94, 152, 217]. Auch in diesen immerhin 28 Fällen (7,4 Prozent der mittels Mehrschrittdiagnostik ermittelten Seren mit bullösem Pemphigoid) scheinen Autoantikörper mit anderen als der 16. nicht-kollagenen Domäne des BP180 zu reagieren, da auch der BP180-ELISA Reaktivität speziell gegen NC16A ermittelt und ebenfalls in keinem der Fälle positiv reagierte [108, 216]. Aus diesem Grund sollten zur Bestimmung bei negativen Zielantigenen auf dem Mosaik LAD-1-Immunoblots und gegebenenfalls weitere Blots gegen andere Bereiche von BP180 (z.B. dem C-terminalen Abschnitt 4575) erfolgen. Dennoch ermöglichen schon Basalmembranfluoreszenz auf dem Ösophagus und Blasendachfluoreszenz auf der Spalthaut den Verdacht auf ein bullöses Pemphigoid.

Neben noch fehlenden Zielantigenen auf dem BIOCHIP™-Mosaik führten diskrepante cut-off-Werte bei der Bewertung von IIF- und ELISA-Ergebnissen zu inkongruenten Diagnosen bei den verschiedenen Verfahren. Bei 22 der 25 inkongruenten Pemphigusdiagnosen konnte die BIOCHIP™-Technologie einen Pemphigus vulgaris diagnostizieren, während der ELISA in der Mehrschrittdiagnostik zwar Autoantikörper gegen Dsg3 nachwies, die Werte jedoch unter dem vom Hersteller angegebenen cut-off-Wert von 20 RE/ml lagen und dies zu keiner Diagnose bei 10 Seren bzw. zur Diagnose eines Pemphigus foliaceus in 12 Fällen führte. In weiteren 34 Fällen wurde übereinstimmend die Diagnose Pemphigus vulgaris erhoben, wobei inkongruente Zielantigene vorlagen. Die BIOCHIP™-Technologie wies Reaktivität gegen Dsg3 und Dsg1 nach, während die Dsg1-Reaktivität bei der ELISA-Testung der Mehrschrittdiagnostik mit Werten zwischen zwei und 19 RE/ml unter dem cut-off lag. Dies galt auch für vier Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid, bei denen durch das BIOCHIP™-Mosaik zusätzliche Zielantigene nachgewiesen wurden, die der ELISA mit Werten unter 20 RE/ml zeigte. Diese Diskrepanzen sind der Bestimmung des cut-offs in der IIF geschuldet. Während der cut-off bei der IIF semiquantitativ bestimmt wird, da alle Seren 1:10 verdünnt bei allen Substraten eingesetzt werden, kann bei dem ELISA jedoch Menge und Konzentration des jeweiligen rekombinanten Zielantigens individuell adaptiert und mittels ROC-Analyse validiert werden [168].

Auch in der Arbeit von van Beek und Kollegen (2012) mit ähnlichem Studienaufbau, aber kleinerem Mosaik mit sechs BIOCHIPs™, erfasste die BIOCHIP™-Technologie ein Serum mit Diagnose Pemphigus vulgaris mehr als die etablierte Mehrschrittdiagnostik [17]. Grund für einen deutlich höheren Anteil Dsg1- und Dsg3-positiver Seren in der BIOCHIP™-Technologie kann durch einen höheren Anteil unspezifischer Signale bedingt sein, sprich durch eine verminderte Spezifität. Allerdings zeigt eine unter dem cut-off liegende positive ELISA-Reaktion, dass eine geringe Reaktivität gegen Dsg1 oder Dsg3 in den getesteten Seren tatsächlich besteht. Zudem ermittelten van Beek und Kollegen in ihrer Arbeit eine sehr hohe Spezifität für Dsg1 und Dsg3 mit 100 und 99,6 Prozent [17]. Ein weiterer Grund ist eine erhöhte Sensitivität des BIOCHIP™-Mosaiks in der Diagnostik von Pemphiguserkrankungen. Zwar lag die Sensitivität bei van Beek und Kollegen mit 98,5 Prozent für Pemphigus vulgaris und 90 Prozent für

Pemphigus foliaceus im Bereich der beschriebenen Sensitivitäten von entsprechenden ELISA-Testsystemen [17, 96, 168], dennoch lassen die in dieser Studie erhobenen Daten vermuten, dass gerade die Dsg1- und Dsg3-BIOCHIPs™ auf dem Mosaik sensibler reagieren, als es der vom Hersteller durch ROC-Analyse bestimmte cut-off bei ELISA-Testsystemen zulässt. Hier müssen ebenfalls die unterschiedlichen Verdünnungen der Seren betrachtet werden. Bei der BIOCHIP™-Technologie wurde eine Fluoreszenzreaktion schon bei einer Verdünnung von 1:10 als positiv gewertet, während Antikörperkonzentrationen in Seren bei ELISA-Testsystemen 1:101 verdünnt gemessen werden. Da ebenfalls zwei der 50 getesteten Blutspenderkontrollen ähnlich den oben beschriebenen Fällen mittels BIOCHIP™-Technologie als positiv und mit Werten unter cut-off im ELISA negativ gewertet wurden, kann man diskutieren, dass die erhöhte Sensitivität mit der BIOCHIP™-Technologie im Vergleich zum entsprechenden ELISA möglicherweise für die niedrigere Spezifität verantwortlich ist.

Mehrere Studien beschrieben bereits das Auftreten von Pemphigus- und Pemphigoidantikörpern in gesunden Blutspendern, eine Arbeit von Prüßmann und Kollegen von 2015 mit 0,9 Prozent, wobei der größte Anteil aus Anti-BP180-Antikörpern bestand [28, 156, 168, 184]. Um den Anteil falsch-positiver Ergebnisse durch niedrige Antikörpertiter bei Gesunden zu senken, könnten Fluoreszenzen in der BIOCHIP™-Technologie erst ab einem Titer von 1:20, 1:50 oder 1:100 als positiv gewertet werden. Andererseits erfasste die BIOCHIP™-Technologie gemessen an der DIF durch die sensitive Diagnostik bei einer Verdünnung von 1:10 12 Pemphigusseren (3,6 Prozent) mehr als die etablierte Mehrschrittdiagnostik (siehe Abb. 3.3, Kapitel 3.1.2), was in dieser Studie einen zusätzlichen Vorteil des BIOCHIP™-Mosaiks darstellte. Die somit höhere Sensitivität des verwendeten BIOCHIP™-Mosaiks im Vergleich zu den Dsg1/3 ELISA-Systemen scheint nicht mit einer verminderten Spezifität einhergegangen zu sein, da nur ein Blutspenderserum (2%) in der vorliegenden Arbeit mit Dsg3 und keines mit Dsg1 reagierte. Zudem gelingt die Differenzierung von *Pemphigus foliaceus* und *Pemphigus vulgaris* häufig anhand des Schleimhautbefalls [132, 177], sodass die Frage, ob eine der Pemphiguserkrankungen vorliegt oder nicht, neben den Zielantigenen vor allem durch Gewebereaktionen des Ösophagus bestätigt werden muss.

Eine hohe Sensitivität im Nachweis von Dsg3-spezifischen Antikörpern ist neben der Diagnostik von Pemphigus vulgaris vor allem in Hinblick auf den anschließenden Ausschluss eines paraneoplastischen Pemphigus sinnvoll [8]; dieser erfolgt in dem neuen BIOCHIP™-Mosaik durch IIF-Testungen auf Harnblasengewebe in einem Schritt. Da Autoantikörper gegen Dsg1 und Dsg3 zum einen teilweise auch bei gesunden Personen zu detektieren und zum anderen nicht bei allen Pemphiguspatienten nachweisbar sind, wird aktuell in der Literatur diskutiert, ob das Vorliegen von Autoantikörpern gegen Dsg1 oder Dsg3 alleine für eine manifeste Erkrankung ausreichend ist, bzw. ob diese Autoantikörper überhaupt pathogenetisch relevant sind [2]. In diesem Zusammenhang wird der Anteil von Pemphiguspatienten ohne Anti-Dsg1/ Dsg3-Antikörpernachweis im Bereich von 5% - 33% angegeben [18, 165, 182]. Da die Diagnose von Pemphiguserkrankungen in dieser Studie primär über den Nachweis von Antikörpern gegen Dsg1 und Dsg3 erfolgte, entspricht hier der Anteil von Pemphigusseren ohne Anti-Dsg1/ Dsg3-Antikörper den nicht über das BIOCHIP™-Mosaik zu diagnostizierenden Pemphiguspatienten und beläuft sich auf einen deutlich niedrigeren Wert von 1,2%, was die Bedeutung von Antikörpern gegen Dsg1 und Dsg3 bei Pemphiguserkrankungen untermauert.

4.2 Das Auftreten von Autoantikörpern gegen Desmocolline in Pemphigus- und Pemphigoidseren

Bei Desmocollinen (Dsc) handelt es sich um Calcium-abhängige Strukturproteine der Cadherinfamilie, die über ihre extrazelluläre Domäne 1 in trans-Stellung miteinander interagieren und somit eine Verbindung zwischen den Intermediärfilamenten der Keratinozyten herstellen [43, 47]. Beschrieben wurde bisher das Auftreten von Anti-Dsc-Autoantikörpern in Pemphigus foliaceus, Pemphigus vulgaris, Pemphigus vegetans, paraneoplastischem Pemphigus, IgA-Pemphigus, Pemphigus herpetiformis und atypischem Pemphigus [57, 84, 86, 87, 93, 144, 147, 198]. Dabei konnten vor allem beim IgA-Pemphigus und beim atypischen Pemphigus Antikörper gegen Dsc bei einem großen Anteil der Patienten nachgewiesen werden [87, 97]. Auf der Basis verschiedener in-vitro-

Modelle mit menschlicher Haut und Zellkulturen humaner Keratinozyten, bei denen die Störung von Dsc-abhängigen Zellkontakten zu einer interzellulären Blasenbildung führte, wurde die pathogenetische Bedeutung von Anti-Dsc-Antikörpern dargestellt [157, 190]. In Mäusen, in deren Haut kein Dsc3 exprimiert wird, konnte ebenfalls eine intraepitheliale Blasenbildung und der Verlust von Haarfollikeln beobachtet werden [38]. In der vorliegenden Studie zeigten 14 der 333 (4,2%) Pemphigusseren, vier der 416 (1%) Pemphigoidseren und eines der 50 Blutspenderseren (2%) Reaktivität gegen Desmocolline. Dabei wurde mittels BIOCHIP™-Technologie bei sieben der 14 Anti-Dsc-Antikörper-positiven Pemphigusseren die Diagnose Pemphigus vulgaris, bei drei Pemphigus foliaceus und bei weiteren drei die Diagnose paraneoplastischer Pemphigus gestellt. Zwei dieser als Pemphigus vulgaris diagnostizierten Seren waren in der DIF in Zusammenschau mit der Klinik als Pemphigus vegetans deklariert worden. Antikörper gegen Dsg1 und 3 wurden dabei jeweils in 10 Fällen detektiert. Das Auftreten von Antikörpern gegen Dsc1-3 als einziges Zielantigen in atypischem Pemphigus [93, 144] wies eine untergeordnete Rolle auf. Lediglich die Diagnostik eines der 14 Anti-Dsc-Antikörper-positiven Pemphigusseren führte zu der Diagnose atypischer Pemphigus. Auch das Auftreten von Autoantikörpern gegen Dsc bei Patienten mit bullösem Pemphigoid und Anti-Laminin γ 1/p200 Pemphigoid in dieser Studie zeigen eine eher geringe Relevanz bei der Diagnostik von bullösen Autoimmundermatosen, insbesondere bei den vergleichsweise häufigen Erkrankungen bullöses Pemphigoid, Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus [140]. Dabei kann allerdings nur eine Aussage über die Assoziation von Antikörpern und deren diagnostischer Bedeutung, nicht jedoch zur Relevanz in der Pathogenese von Pemphiguserkrankungen getroffen werden, welche in anderen Studien mehrfach herausgestellt wurde [38, 133, 157, 190].

Interessanterweise zeigten drei von vier Seren, die von den 749 Studienserren positiv auf paraneoplastischen Pemphigus getestet wurden, Reaktivität gegen Dsc1 (zwei Fälle) und Dsc2 (ein Fall). Die Assoziation von Anti-Dsc-Autoantikörpern mit paraneoplastischem Pemphigus wurde bereits anderweitig beschrieben [144]. In einer Arbeit von Ohzono und Kollegen in 2015 wurden sogar in ca. der Hälfte der Seren von Patienten mit paraneoplastischem Pemphigus Anti-Dsc-Antikörper gefunden. Hier wies der größte Anteil an Seren jedoch Antikörper

gegen Dsc3 auf. Dennoch zeigte sich auch eine deutliche Relevanz von Dsc1 und Dsc2 mit etwa 20% und 40% der getesteten Seren [147]. Auch die in dieser Studie getestete Kohorte zeigt ein ähnlich hohes Auftreten von Anti-Dsc-Antikörpern in paraneoplastischem Pemphigus, wobei eine Aussage bei insgesamt vier Seren von Patienten mit paraneoplastischem Pemphigus nur eingeschränkt möglich ist. Zwei der 257 durch die BIOCHIP™-Technologie auf Pemphigus vulgaris positiv getesteten Seren wurden durch die Kooperationszentren anhand der entsprechenden Klinik in Kombination mit dem Ergebnis der DIF als Pemphigus vegetans beschrieben. Interessanterweise zeigten beide Seren neben Anti-Dsg3-Reaktivität auch Autoantikörper gegen Dsc3 bzw. Dsc3 und 1. Das Auftreten von Anti-Dsc-Antikörpern bei Pemphigus vegetans war bereits von Hashimoto und Kollegen 1994 durch Analyse mittels Immunoblot beschrieben worden [84]. Die hier durchgeführte multizentrische prospektive Studie indiziert, dass die Suche nach Dsc-spezifischen Autoantikörpern in der Diagnostik von Pemphigus vegetans einen zusätzlichen Nutzen aufweisen könnte.

Obwohl diese Studie somit der Reaktivität gegen Desmocolline bei bullösen Autoimmundermatosen insgesamt eine untergeordnete Rolle zuweist, könnte diese neben einer Relevanz in bestimmten Erkrankungen wie dem Pemphigus vegetans auch in einzelnen ethnischen Gruppen eine höhere Bedeutung haben: Sowohl bezogen auf die gesamten eingesendeten Seren als auch speziell auf die Pemphigusseren zeigten die Kooperationszentren aus China (Peking) und Australien (Sydney) einen deutlich höheren Anteil an Seren mit Reaktivität gegen Desmocolline als die übrigen, die alle zwischen 1,2 bis 4 Prozent lagen bzw. gar keine Seren mit Dsc-Reaktivität aufwiesen (darunter Posen, Warschau, Antalya, Rom und Brünn, siehe Kapitel 3.2). Auch die überwiegende Zahl der in der Literatur beschriebenen Fälle mit Anti-Dsc-Autoreaktivität kommt aus dem asiatischen, speziell aus dem japanischen Raum durch Hashimoto und Kollegen [57, 84, 86, 87, 93, 198]. Ebenfalls fällt auf, dass zwei der drei Anti-Dsc-Antikörper-positiven Seren von Patienten mit paraneoplastischem Pemphigus aus dem asiatischen Kooperationszentrum stammen. Auch hier wurde die Bedeutung durch Ohzono und Kollegen 2015 in Japan beschrieben, wobei auch US-amerikanische und europäische Patienten in die Studie mit eingeschlossen wurden (Anteil unbekannt) [147]. Obwohl diese Studie den amerikanischen und

afrikanischen Kontinent nicht betrachtet und eine für statistische Aussagen vergleichsweise geringe Kohortengröße von Anti-Dsc-Antikörper-positiven Seren aufweist, zeigt sich eine Relevanz von Anti-Dsc-Autoantikörpern in der Diagnostik besonders im australischen und asiatischen Raum.

Mit einer Spezifität und Sensitivität von 98 bis 99% bei Dsg1/3-positivem Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus spielt die Testung auf Serumantikörper gegen Dsc keine diagnostische Rolle. Das entsprechende Testsystem wird daher auch nicht kommerziell angeboten. Für Patienten mit Pemphigus vegetans und paraneoplastischem Pemphigus zeigt diese Studie jedoch eine deutliche Relevanz. Zudem scheint, wie mehrfach in der Literatur beschrieben, der Nachweis von Antikörpern gegen Dsc bei Patienten mit atypischem Pemphigus und IgA-Pemphigus hilfreich und sinnvoll zu sein [87, 93, 144].

4.3 Verbesserung der Auswertungsqualität durch Verwendung von Absorptionspuffer und IgG₄-Konjugaten

Obwohl ein interzelluläres Muster in der IIF als Pemphigus-spezifisch gilt, sind Fälle von Patienten ohne eine Pemphiguserkrankung, doch mit einem solchen Fluoreszenzmuster zwischen den Keratinozyten durch Pemphigus-ähnliche Autoantikörper bei Autoimmundermatosen wie bullösem Pemphigoid, Schleimhautpemphigoid, Dermatitis herpetiformis und Epidermolysis bullosa acquisita sowie auch bei Patienten mit Pilzinfektionen beschrieben [4, 49, 89, 95, 126, 151]. Des Weiteren wurden bereits 1969 von Ablin und Kollegen diese Fluoreszenzreaktionen zum einen bei etwa 20% einer Kohorte von stark betroffenen Verbrennungsoptern und zum anderen interessanterweise bei Patienten mit hohen Titern von Antikörpern gegen die Blutgruppenantigene A und B gefunden [1]. Dabei ließen sich die Fluoreszenzreaktionen bei diesen Seren im Gegensatz zu denen von Patienten mit klinisch manifestem Pemphigus durch das Hinzugeben der Blutgruppenantigene A und B eliminieren [1]. Zwei Jahre zuvor war bereits von Grob und Kollegen eine Korrelation zwischen dem Auftreten eines interzellulären Musters in der IIF und der Blutgruppe 0 beschrieben worden [77].

1983 zeigten in einer Untersuchung von Ahmed und Kollegen 14 von 1500 Patienten ohne eine Pemphiguserkrankung ein interzelluläres Fluoreszenzmuster auf Epithel von Affenösophagus [4]. Bei neun Seren ließen sich diese Fluoreszenzen durch das Hinzugeben von Blutgruppenantigenen inhibieren, bei den anderen fünf Patienten wurde im Verlauf eine Pemphigoiderkrankung nachgewiesen [4]. Auch Arbeiten von Goldblatt und Kollegen 2002 und Lee und Kollegen 2010 mit ähnlichem Studienaufbau bestätigten durch Anti-A/B-Blutgruppen-Antikörper hervorgerufene interzelluläre Fluoreszenzmuster [72, 123]. In dieser Studie zeigte sich in allen vier Inkubationen (IgA, IgG, IgG/IgG₄-Gemisch und sequentielle Inkubation) eine statistisch signifikante Reduktion der unspezifischen interzellulären Fluoreszenzsignale zwischen 17,1% und 55,5% durch Verwendung eines Absorptionspuffers mit Blutgruppenantigenen. Der Nutzen des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffers, welcher Antikörper gegen die Blutgruppenantigene A und B absorbiert, zeigt ebenfalls die Relevanz von Blutgruppenantikörpern bei falsch-positiven interzellulären Fluoreszenzsignalen [4, 72, 77, 123, 126]. Die zusätzlich beschriebenen von den Blutgruppenantigenen unabhängigen Pemphigus-ähnlichen Antikörper bei z.B. bullösem Pemphigoid, Schleimhautpemphigoid oder Dermatitis herpetiformis könnten die verbleibenden, falsch-positiven interzellulären Immunfluoreszenzen nach Anwendung des Absorptionspuffers in dieser Studie erklären [4, 49, 89, 95]. Andererseits können gegebenenfalls die Blutgruppenantikörper nicht vollständig mittels Absorptionspuffer gebunden werden und zeigen somit eine Restreaktivität. Obwohl durch den Absorptionspuffer eine deutliche Reduktion der unspezifischen Signale erreicht wurde, konnten keine zusätzlichen oder anderen Diagnosen im Vergleich zur Inkubation mit PBS-T ermittelt werden. Ein Verlust von korrekten Diagnosen insbesondere bei Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus trat bei Inkubation mit Absorptionspuffer ebenfalls nicht auf. Grund hierfür sind vor allem die auf dem Mosaik zusätzlich enthaltenen Zielantigene, die bei unklaren Gewebefunden die serologische Diagnose sichern. In der BIOCHIP™-Technologie sind die Betrachtung der Gewebe und entsprechender Zielantigene in einem Schritt zusammengefasst [17]. In der etablierten Mehrschritt Diagnostik werden die Gewebereaktionen der Zielantigenbestimmung vorangestellt [178], sodass der Absorptionspuffer besonders hier einen Vorteil für die Diagnostik

darstellen könnte. Zusätzlich weist die Inkubation mit Absorptionspuffer vor allem in Laboratorien einen Vorteil auf, die nicht täglich in der Diagnostik von bullösen Autoimmundermatosen tätig sind und so die verminderte Erfahrung des Ablesenden durch die Reduktion von unspezifischen Signalen teils kompensiert werden kann.

Neben der Verminderung von unspezifischen desmosomalen Fluoreszenzreaktionen konnte in dieser Studie die Ablesequalität auch durch Stärkung der diagnosespezifischen Signale verbessert werden. In mehreren Studien wurde bereits die Rolle von verschiedenen IgG-Subklassen bei Pemphigus- und Pemphigoiderkrankungen herausgestellt und dabei überwiegend die Reaktivität von IgG₄- und IgG₁-Autoantikörpern beschrieben [24, 25, 32, 60, 67]. Brooks und Kollegen untersuchten 1989 systematisch die Antikörperklassen im Serum von Patienten mit Pemphigus und Pemphigoid mithilfe der IIF [32]. Sie beschrieben, dass bei bullösem Pemphigoid und Pemphiguserkrankungen vor allem IgG₁ und IgG₄ an der Bildung des Fluoreszenzmusters beteiligt sind [32]. Weitere Studien bestätigten im Verlauf die Prädominanz dieser Subklassen mit Immunoblot und ELISA-Verfahren [24, 60]. Obwohl IgG₄ im Gegensatz zu IgG₁₋₃ nicht an der Komplementaktivierung als wichtigem Schritt in der Pathogenese der Erkrankungen beteiligt ist [20, 32], zeigten Bhol und Kollegen, dass sich gerade in aktiven Krankheitsphasen von Pemphigus vulgaris neben IgG₁ auch IgG₄ gehäuft auffinden ließ, während in Krankheitsremission kein IgG₄ mehr nachgewiesen werden konnte [24, 25]. Die pathogenetische Relevanz dieser Dominanz der IgG₄-Subklasse konnte in vitro unter anderem durch den mit dem IgG₄-Spiegel korrelierenden akantholytischen Effekt auf Keratinozyten untermauert werden [67]. Bei der Inkubation mit IgG₄-Konjugaten in der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Steigerung der Immunfluoreszenzintensität erreicht werden, die auf die Relevanz des IgG₄ in der Diagnostik bullöser Autoimmundermatosen hinweist. Interessanterweise zeigten die Ergebnisse besondere Signifikanz bei den Gewebesubstraten Ösophagus und humaner Spalthaut. Neben einer durchschnittlichen Steigerung der Fluoreszenzintensität zeigten sich in der Inkubation mit dem IgG/IgG₄-Gemisch 10 Prozent mehr spezifische Fluoreszenzsignale, welche mit dem herkömmlichen IgG-Konjugat nicht detektiert werden konnten. Da die Inkubation von Gewebeschnitten mit Patientenseren auch

in der Mehrschrittdiagnostik einen entscheidenden Diagnostikteil darstellt, könnte die Inkubation mit IgG₄-Konjugaten hier von Nutzen sein [178]. Neben deutlicher Zunahme der Fluoreszenzstärken konnten sieben der 750 gestellten Diagnosen ausschließlich durch zusätzlich detektierte Zielantigene mithilfe des IgG₄-Konjugats ermittelt werden (drei Fälle von Pemphigus vulgaris, zwei von Pemphigus foliaceus, einer von atypischem Pemphigus und ein Fall von bullösem Pemphigoid). Sechs weitere Fälle von Verdacht auf bullöses Pemphigoid durch entsprechende Gewebereaktionen konnten anhand von neu aufgetretenen Reaktionen der Zielantigene bestätigt werden. Dies verdeutlicht die Relevanz von IgG₄-Antikörpern insbesondere gegen Strukturproteine der dermoepidermalen Junktionszone bei bullösem Pemphigoid [20, 27, 60], zeigt aber auch die Rolle von IgG₄-Antikörpern bei interzellulären Bindungsstrukturen.

Die beste Ablesequalität konnte hierbei durch eine Verbesserung der Immunfluoreszenzintensität mit mit IgG₄ angereichertem IgG-Konjugat im Vergleich zur sequentiellen Inkubation und mit IgG allein erzielt werden. Alle zusätzlich im Vergleich zum herkömmlichen IgG-Konjugat gestellten Diagnosen konnten mittels IgG/IgG₄-Gemisch gestellt werden. Im Vergleich zu der sequentiellen Inkubation konnten zwischen 4,5 und 15,1% mehr spezifische Fluoreszenzreaktionen auf den BIOCHIPs™ durch Inkubation mit dem Konjugatgemisch erzielt werden. Ob z.B. die zusätzlichen Waschschrte zu mehr Manipulation an den BIOCHIPs™ und dadurch zu schlechteren Ergebnissen im Vergleich zu der einmaligen Inkubation beim Gemisch führen, bleibt offen. Auch kann in dieser Arbeit nicht geklärt werden, ob die umgekehrte Durchführung der sequentiellen Inkubation (erst Inkubation mit Gesamt-IgG, gefolgt von IgG₄) bessere Ergebnisse liefern könnte. Hier wären weitere Studien hilfreich. Durch die einmalige Inkubationsreihe nimmt die Testung mit IgG/IgG₄-Gemisch allerdings nur die Hälfte der Zeit im Vergleich zur sequentiellen Inkubation ein, was die praktische Durchführung der Testung optimiert. Daher weist diese Studie darauf hin, dass der Einsatz von IgG₄ einen deutlichen Nutzen in der IIF-Diagnostik von bullösen Autoimmundermatosen darstellen könnte. Besonders der Einsatz des IgG/IgG₄-Konjugatgemischs in der Diagnostik mittels BIOCHIP™-Technologie steigert die Ablese- und Auswertungsqualität. Weitere Studien zum Einsatz von

mit IgG₄ angereicherten IgG-Konjugaten auch in der Mehrschrittdiagnostik sollten diese Ergebnisse bestätigen.

Der Vergleich der PBS-T- und Absorptionspufferinkubationen zeigte eine leichte Abschwächung aller diagnosespezifischen Fluoreszenzsignale in der Inkubation mit Absorptionspuffer. Dies könnte einen negativen Einfluss auf die Ablesequalität haben. Betroffen waren hier vor allem die Signale der EUROPLUS®-Chips, gefolgt von den Antigen-exprimierenden Zellen, während die Gewebe kaum beeinflusst wurden. Interessanterweise zeigte sich in den beiden IgG₄-Inkubationen im Vergleich zum IgG eine geringere Abschwächung der Signale, was einen Vorteil bei der Verwendung des Absorptionspuffers darstellen könnte. Da darüber hinaus speziell bei dem IgG/IgG₄-Konjugatgemisch von allen IgG-Inkubationen die geringste Anzahl unspezifischer Fluoreszenzsignale auftrat und diese zusätzlich mit 55% am stärksten durch den Absorptionspuffer reduziert werden konnten, weist diese Studie einen klaren Vorteil in der kombinierten Verwendung von Absorptionspuffer und IgG/IgG₄-Konjugatgemisch auf. Hier ist zu beachten, dass der Absorptionspuffer statistisch die Ablesequalität steigerte, durch das IgG₄ aber auch weitere Diagnosen gestellt werden konnten, sodass vor allem letzteres in der IIF-Diagnostik einen deutlichen Vorteil erbringen könnte.

Da dies die erste große Studie ist, die den Einfluss von Absorptionspuffer und IgG₄ in der Diagnostik von bullösen Autoimmundermatosen in der BIOCHIP™-Technologie beleuchtet, wären weitere Studien mit einem höheren verblindeten Anteil negativer Kontrollseren hilfreich, auch um einen möglichen Vorteil in der etablierten Mehrschrittdiagnostik herauszustellen.

5 Zusammenfassung

Bullöse Autoimmundermatosen sind eine Gruppe von seltenen blasenbildenden Erkrankungen der Haut, die durch Autoreaktivität gegen Strukturproteine der Epidermis (Pemphigus) und dermo-epidermalen Junctionszone (Pemphigoid) hervorgerufen werden. Bei Pemphiguserkrankungen wurden neben den Zielantigenen Desmoglein 1 und 3 auch Desmocollin(Dsc)-spezifische Antikörper beschrieben. Die serologische Diagnostik von bullösen Autoimmundermatosen umfasst aktuell eine etablierte Mehrschrittdiagnostik, bestehend aus indirekter Immunfluoreszenz (IIF) mittels Gewebeschnitten, ELISA und Immunoblot unter Verwendung der spezifischen Zielantigene. Neben diesem Standard wurde ein BIOCHIP™-Mosaik entwickelt, welches auf Basis der IIF in einem einzigen Inkubationsschritt sowohl Reaktionen auf Gewebeschnitten als auch Reaktivität gegen entsprechende Zielantigene nachweisen kann. In dieser multizentrischen prospektiven Studie wurden der diagnostische Nutzen der BIOCHIP™-Technologie und Möglichkeiten zur Verbesserung der Auswertungsqualität sowie die Assoziation von Anti-Dsc-Antikörpern bei bullösen Autoimmundermatosen untersucht. Dafür wurde die weltweit bisher größte Kohorte mit 749 Seren von Patienten mit positiver DIF für bullöse Autoimmundermatosen untersucht. Zudem wurden 50 Blutspenderseren inkludiert. Beide Kohorten wurden mit einem neuen BIOCHIP™-Mosaik mit 12 BIOCHIPs™ im Vergleich zur Mehrschrittdiagnostik analysiert und zusätzlich auf einem Dsc-Mosaik getestet. Alle Seren wurden zudem mit speziellen IgG₄-Konjugaten (mit IgG₄ angereichertes IgG und sequentiell mit reinem IgG₄ und folgend mit IgG inkubierte Mosaik) inkubiert und analysiert. Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid, die zusätzlich auf Ösophagus unspezifische interzelluläre Fluoreszenzen zeigten, wurden mit einem Absorptionpuffer gegen unspezifische desmosomale Fluoreszenzreaktionen (u.a. bedingt durch struktur-ähnliche Anti-A- und Anti-B-Blutgruppenantikörper) inkubiert und untersucht. Hohe Werte im Vergleichskoeffizienten Cohens Kappa zwischen 0,84 und 1,00 belegten eine gute Übereinstimmung der BIOCHIP™-Technologie mit der konventionellen Mehrschrittdiagnostik. Mithilfe des 12er BIOCHIP™-Mosaiks konnten 94,8% der Seren diagnostiziert werden. Bei 21 der 39 nicht

diagnostizierten Seren handelte es sich um Seren von Patienten mit Anti-Laminin 332 Schleimhautpemphigoid und Anti-Laminin γ 1/p200 Pemphigoid, die durch das Fehlen Zielantigen-spezifischer BIOCHIPs™ auf dem Mosaik nicht detektiert werden konnten. Anti-Dsc-Autoantikörper wurden bei 14 der 333 Pemphigus-, 4 der 416 Pemphigoidseren und einem Blutspenderserum detektiert mit hohem Anteil bei paraneoplastischem Pemphigus (drei von vier Seren) und Pemphigus vegetans (zwei von zwei Seren). In den herkömmlichen IgA- und IgG- sowie den speziellen IgG₄-Konjugaten konnte der Anteil unspezifischer desmosomaler Fluoreszenzreaktionen durch Verwendung des Absorptionspuffers um 17% bis 56% reduziert werden. Die höchste Signifikanz wies dabei das IgG/IgG₄-Konjugatgemisch mit einer Reduktion von 55% auf. Ebenfalls durch das IgG/IgG₄-Gemisch konnten sieben (0,9%) zusätzliche Diagnosen im Vergleich zu dem herkömmlichen IgG-Konjugat ermittelt werden. Zudem zeigten sich hier 8,5% mehr Gewebefluoreszenzen als bei den Inkubationen mit IgG-Konjugat (bei den Zielantigenen 0-1,8% mehr Reaktionen). Im Vergleich mit der sequentiellen IgG₄-Inkubation konnten durch das IgG/IgG₄-Gemisch zwischen 4,5% und 15% mehr Fluoreszenzreaktionen detektiert werden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass sowohl für häufigere bullöse Autoimmundermatosen wie Pemphigus vulgaris, Pemphigus foliaceus und bullöses Pemphigoid, aber auch Epidermolysis bullosa acquisita, Dermatitis herpetiformis und paraneoplastischen Pemphigus das neue BIOCHIP™-Mosaik eine sensitive, spezifische, effiziente und schnellere Diagnostikmethode darstellt und gerade in Laboratorien, in denen die etablierte Mehrschrittdiagnostik nicht zur Verfügung steht, durch die simple Anwendung eine gute Alternative sein kann. Weitere Zielantigene wie Laminin 332 und Laminin γ 1/p200 Protein könnten das Mosaik optimieren. Antikörper gegen Desmocolline erwiesen sich vor allem in der Diagnostik seltener Pemphiguserkrankungen als relevant. Sowohl der Absorptionspuffer als auch speziell das IgG/IgG₄-Gemisch wiesen in dieser Studie einen deutlichen diagnostischen Vorteil in der BIOCHIP™-Technologie auf. Durch Reduktion unspezifischer Gewebereaktionen durch den Absorptionspuffer und Stärkung der spezifischen Fluoreszenzreaktionen durch den Einsatz von IgG₄ ergänzen sich beide Verfahren in der Verbesserung der Auswertequalität und könnten auch einen Vorteil in der IIF-Gewebeauswertung der etablierten Mehrschrittdiagnostik darstellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Ablin RJ, Milgrom F, Kano K, Rapaport FT, Beutner EH (1969) Pemphigus-like antibodies in patients with skin burns. *Vox Sang* 16, 73–75
2. Ahmed AR, Carrozzo M, Caux F, Cirillo N, Dmochowski M, Alonso AE, Gniadecki R, Hertl M, López-Zabalza MJ, Lotti R, Pincelli C, Pittelkow M, Schmidt E, Sinha AA, Sprecher E, Grando SA (2016) Monopathogenic vs multipathogenic explanations of pemphigus pathophysiology. *Exp Dermatol* 25, 839–846
3. Ahmed AR, Kurgis BS, Rogers RS (1991) Cicatricial pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 24, 987–1001
4. Ahmed AR, Workman S (1983) Anti-intercellular substance antibodies. Presence in serum samples of 14 patients without pemphigus. *Arch Dermatol* 119, 17–21
5. Amagai M, Karpati S, Prussick R, Klaus-Kovtun V, Stanley JR (1992) Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J Clin Invest* 90, 919–926
6. Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR (1991) Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 67, 869–877
7. Amagai M, Komai A, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Yamada T, Kitajima Y, Ohya K, Iwanami H, Nishikawa T (1999) Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 140, 351–357
8. Amagai M, Nishikawa T, Nousari HC, Anhalt GJ, Hashimoto T (1998) Antibodies against desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) are present in sera from patients with paraneoplastic pemphigus and cause acantholysis in vivo in neonatal mice. *J Clin Invest* 102, 775–782
9. Amagai M, Tsunoda K, Zillikens D, Nagai T, Nishikawa T (1999) The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J Am Acad Dermatol* 40, 167–170
10. Anhalt GJ (2004) Paraneoplastic Pemphigus. *J Investig Dermatol Symp Proc* 9, 29–33
11. Anhalt GJ, Kim SC, Stanley JR, Korman NJ, Jabs DA, Kory M, Izumi H, Ratrie H, Mutasim D, Ariss-Abdo L (1990) Paraneoplastic pemphigus. An autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. *N Engl J Med* 323, 1729–1735
12. Aumailley M (2013) The laminin family. *Cell Adhes Migr* 7, 48–55
13. Avalos-Díaz E, Olague-Marchan M, López-Swidorski A, Herrera-Esparza R, Díaz LA (2000) Transplacental passage of maternal pemphigus foliaceus autoantibodies induces neonatal pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 43, 1130–1134

14. Baican A, Baican C, Chiriac G, Chiriac MT, Macovei V, Zillikens D, Ciuce D, Sitaru C (2010) Pemphigus vulgaris is the most common autoimmune bullous disease in Northwestern Romania. *Int J Dermatol* 49, 768–774
15. Balding SD, Prost C, Diaz LA, Bernard P, Bedane C, Aberdam D, Giudice GJ (1996) Cicatricial pemphigoid autoantibodies react with multiple sites on the BP180 extracellular domain. *J Invest Dermatol* 106, 141–146
16. Bastuji-Garin S, Joly P, Lemordant P, Sparsa A, Bedane C, Delaporte E, Roujeau J-C, Bernard P, Guillaume J-C, Ingen-Housz-Oro S, Maillard H, Pauwels C, Picard-Dahan C, Dutronc Y, Richard M-A, on behalf of the French Study Group for Bullous Diseases (2011) Risk Factors for Bullous Pemphigoid in the Elderly: A Prospective Case–Control Study. *J Invest Dermatol* 131, 637–643
17. van Beek N, Rentzsch K, Probst C, Komorowski L, Kasperkiewicz M, Fechner K, Blöcker IM, Zillikens D, Stöcker W, Schmidt E (2012) Serological diagnosis of autoimmune bullous skin diseases: prospective comparison of the BIOCHIP mosaic-based indirect immunofluorescence technique with the conventional multi-step single test strategy. *Orphanet J Rare Dis* 7, 49
18. Belloni-Fortina A, Faggion D, Pigozzi B, Peserico A, Bordignon M, Baldo V, Alaibac M (2009) Detection of autoantibodies against recombinant desmoglein 1 and 3 molecules in patients with pemphigus vulgaris: correlation with disease extent at the time of diagnosis and during follow-up. *Clin Dev Immunol* 2009, e187864
19. Bernard P, Antonicelli F, Bedane C, Joly P, Le Roux-Villet C, Duvert-Lehembre S, Rousselle P, Prost-Squarcioni C (2013) Prevalence and clinical significance of anti-laminin 332 autoantibodies detected by a novel enzyme-linked immunosorbent assay in mucous membrane pemphigoid. *JAMA Dermatol* 149, 533–540
20. Bernard P, Aucouturier P, Denis F, Bonnetblanc JM (1990) Immunoblot analysis of IgG subclasses of circulating antibodies in bullous pemphigoid. *Clin Immunol Immunopathol* 54, 484–494
21. Bernard P, Prost C, Durepaire N, Basset-Seguin N, Didierjean L, Saurat JH (1992) The major cicatricial pemphigoid antigen is a 180-kD protein that shows immunologic cross-reactivities with the bullous pemphigoid antigen. *J Invest Dermatol* 99, 174–179
22. Bernard P, Vaillant L, Labeille B, et al (1995) Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three french regions. *Arch Dermatol* 131, 48–52
23. Bertram F, Bröcker E-B, Zillikens D, Schmidt E (2009) Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *J Dtsch Dermatol Ges* 7, 434–439
24. Bhol K, Mohimen A, Ahmed AR (1994) Correlation of subclasses of IgG with disease activity in pemphigus vulgaris. *Dermatology* 189, 85–89
25. Bhol K, Natarajan K, Nagarwalla N, Mohimen A, Aoki V, Ahmed AR (1995) Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenic and nonpathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris: a model for autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5239–5243

26. Bieber K, Sun S, Ishii N, Kasperkiewicz M, Schmidt E, Hirose M, Westermann J, Yu X, Zillikens D, Ludwig RJ (2010) Animal models for autoimmune bullous dermatoses. *Exp Dermatol* 19, 2–11
27. Bird P, Friedmann PS, Ling N, Bird AG, Thompson RA (1986) Subclass distribution of IgG autoantibodies in bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 86, 21–25
28. Blöcker IM, Dähnrich C, Probst C, Komorowski L, Saschenbrecker S, Schlumberger W, Stöcker W, Zillikens D, Schmidt E (2012) Epitope mapping of BP230 leading to a novel enzyme-linked immunosorbent assay for autoantibodies in bullous pemphigoid: BP230 epitope mapping and ELISA. *Br J Dermatol* 166, 964–970
29. Bonciani D, Verdelli A, Bonciolini V, D'Errico A, Antiga E, Fabbri P, Caproni M (2012) Dermatitis herpetiformis: from the genetics to the development of skin lesions. *Clin Dev Immunol* 2012, 239691
30. Borradori L, Sonnenberg A (1999) Structure and Function of Hemidesmosomes: More Than Simple Adhesion Complexes. *J Invest Dermatol* 112, 411–418
31. Brandt O, Rafei D, Podstawa E, Niedermeier A, Jonkman MF, Terra JB, Hein R, Hertl M, Pas HH, Müller R (2012) Differential IgG recognition of desmoglein 3 by paraneoplastic pemphigus and pemphigus vulgaris sera. *J Invest Dermatol* 132, 1738–1741
32. Brooks WS, Lee YY, Abell E, Deng JS (1989) Comparison of IgG subclasses and complement binding activity of autoantibodies from patients with bullous pemphigoid and pemphigus. *J Clin Lab Anal* 3, 307–311
33. Buijsrogge JJA, Diercks GFH, Pas HH, Jonkman MF (2011) The many faces of epidermolysis bullosa acquisita after serration pattern analysis by direct immunofluorescence microscopy. *Br J Dermatol* 165, 92–98
34. Chams-Davatchi C (2011) Prevalence and treatment of pemphigus in Iran. *Dermatol Clin* 29, 681–683
35. Chan LS, Ahmed AR, Anhalt GJ, Bernauer W, Cooper KD, Elder MJ, Fine J-D, 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, Iii RSR, Setterfield JF, West DP, Wojnarowska F, Woodley DT, Yancey KB, Zillikens D, Zone JJ (2002) The first international consensus on mucous membrane pemphigoid: definition, diagnostic criteria, pathogenic factors, medical treatment and prognostic indicators. *Arch Dermatol* 138, 370–379
36. Chan PT, Ohyama B, Nishifuji K, Yoshida K, Ishii K, Hashimoto T, Amagai M (2010) Immune response towards the amino-terminus of desmoglein 1 prevails across different activity stages in nonendemic pemphigus foliaceus. *Br J Dermatol* 162, 1242–1250
37. Charneux J, Lorin J, Vitry F, Antonicelli F, Reguiat Z, Barbe C, Tabary T, Grange F, Bernard P (2011) Usefulness of BP230 and BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assays in the initial diagnosis of bullous pemphigoid: a retrospective study of 138 patients. *Arch Dermatol* 147, 286–291
38. Chen J, Den Z, Koch PJ (2008) Loss of desmocollin 3 in mice leads to epidermal blistering. *J Cell Sci* 121, 2844–2849

39. Chen KR, Shimizu S, Miyakawa S, Ishiko A, Shimizu H, Hashimoto T (1996) Coexistence of psoriasis and an unusual IgG-mediated subepidermal bullous dermatosis: identification of a novel 200-kDa lower lamina lucida target antigen. *Br J Dermatol* 134, 340–346
40. Chen M, Chan LS, Cai X, O'Toole EA, Sample JC, Woodley DT (1997) Development of an ELISA for rapid detection of anti-type VII collagen autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol* 108, 68–72
41. Chen M, Kim GH, Prakash L, Woodley DT (2012) Epidermolysis bullosa acquisita: autoimmunity to anchoring fibril collagen. *Autoimmunity* 45, 91–101
42. Chen YJ, Wu CY, Lin MW, Chen TJ, Liao KK, Chen YC, Hwang CY, Chu SY, Chen CC, Lee DD, Chang YT, Wang WJ, Liu HN (2011) Comorbidity profiles among patients with bullous pemphigoid: a nationwide population-based study. *Br J Dermatol* 165, 593–599
43. Chitaev NA, Troyanovsky SM (1997) Direct Ca^{2+} -dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell–cell adhesion. *J Cell Biol* 138, 193–201
44. Christophoridis S, Büdinger L, Borradori L, Hunziker T, Merk HF, Hertl M (2000) IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of BP180 in patients with bullous and cicatricial pemphigoid and linear IgA bullous dermatosis. *Br J Dermatol* 143, 349–355
45. Clarindo MV, Possebon AT, Soligo EM, Uyeda H, Ruaro RT, Empinotti JC (2014) Dermatitis herpetiformis: pathophysiology, clinical presentation, diagnosis and treatment. *An Bras Dermatol* 89, 865–877
46. Claudepierre T, Manglapus MK, Marengi N, Radner S, Champlaud M-F, Tasanen K, Bruckner-Tuderman L, Hunter DD, Brunken WJ (2005) Collagen XVII and BPAG1 expression in the retina: evidence for an anchoring complex in the central nervous system. *J Comp Neurol* 487, 190–203
47. Collins JE, Legan PK, Kenny TP, MacGarvie J, Holton JL, Garrod DR (1991) Cloning and sequence analysis of desmosomal glycoproteins 2 and 3 (desmocollins): cadherin-like desmosomal adhesion molecules with heterogeneous cytoplasmic domains. *J Cell Biol* 113, 381–391
48. Cowin P, Matthey D, Garrod D (1984) Identification of desmosomal surface components (desmocollins) and inhibition of desmosome formation by specific Fab'. *J Cell Sci* 70, 41–60
49. Cram DL, Griffith MR, Fukuyama K (1974) Pemphigus-like antibodies in cicatricial pemphigoid. *Arch Dermatol* 109, 235–238
50. Dainichi T, Koga H, Tsuji T, Ishii N, Ohyama B, Ueda A, Natsuaki Y, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, Zillikens D, Hashimoto T (2010) From anti-p200 pemphigoid to anti-laminin gamma1 pemphigoid. *J Dermatol* 37, 231–238
51. Damoiseaux J, van Rijsingen M, Warnemünde N, Dähnrich C, Fechner K, Cohen Tervaert JW (2012) Autoantibody detection in bullous pemphigoid: Clinical evaluation of the EUROPLUS™ dermatology mosaic. *J Immunol Methods* 382, 76–80

52. Di Zenzo G, Grosso F, Terracina M, Mariotti F, De Pità O, Owaribe K, Mastrogiacomo A, Sera F, Borradori L, Zambruno G (2004) Characterization of the anti-BP180 autoantibody reactivity profile and epitope mapping in bullous pemphigoid patients. *J Invest Dermatol* 122, 103–110
53. Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Fontao L, Calabresi V, Hofmann SC, Hellmark T, Sebbag N, Pedicelli C, Sera F, Lacour J-P, Wieslander J, Bruckner-Tuderman L, Borradori L, Zambruno G, Hertl M (2008) Multicenter prospective study of the humoral autoimmune response in bullous pemphigoid. *Clin Immunol Orlando Fla* 128, 415–426
54. Diaz LA, Ratrie H, Saunders WS, Futamura S, Squiquera HL, Anhalt GJ, Giudice GJ (1990) Isolation of a human epidermal cDNA corresponding to the 180-kD autoantigen recognized by bullous pemphigoid and herpes gestationis sera. Immunolocalization of this protein to the hemidesmosome. *J Clin Invest* 86, 1088–1094
55. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D (1997) Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 3, 797–801
56. Dilling A, Rose C, Hashimoto T, Zillikens D, Shimanovich I (2007) Anti-p200 pemphigoid: a novel autoimmune subepidermal blistering disease. *J Dermatol* 34, 1–8
57. Dmochowski M, Hashimoto T, Garrod DR, Nishikawa T (1993) Desmocollins I and II are recognized by certain sera from patients with various types of pemphigus, particularly brazilian pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol* 100, 380–384
58. Domloge-Hultsch N, Anhalt GJ, Gammon WR, Lazarova Z, Briggaman R, Welch M, Jabs DA, Huff C, Yancey KB (1994) Antiepiligrin cicatricial pemphigoid. A subepithelial bullous disorder. *Arch Dermatol* 130, 1521–1529
59. Domloge-Hultsch N, Gammon WR, Briggaman RA, Gil SG, Carter WG, Yancey KB (1992) Epiligrin, the major human keratinocyte integrin ligand, is a target in both an acquired autoimmune and an inherited subepidermal blistering skin disease. *J Clin Invest* 90, 1628–1633
60. Döpp R, Schmidt E, Chimanovitch I, Leverkus M, Bröcker EB, Zillikens D (2000) IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in Bullous pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *J Am Acad Dermatol* 42, 577–583
61. Egan CA, Lazarova Z, Darling TN, Yee C, Coté T, Yancey KB (2001) Anti-epiligrin cicatricial pemphigoid and relative risk for cancer. *Lancet* 357, 1850–1851
62. Eming R, Hertl M (2006) Autoimmune bullous disorders. *Clin Chem Lab Med* 44, 144–149
63. Engvall E, Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871–874
64. Eyre RW, Stanley JR (1987) Human autoantibodies against a desmosomal protein complex with a calcium-sensitive epitope are characteristic of pemphigus foliaceus patients. *J Exp Med* 165, 1719–1724

65. Eyre RW, Stanley JR (1988) Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen. *J Clin Invest* 81, 807–812
66. Frew JW, Murrell DF (2011) Paraneoplastic pemphigus (paraneoplastic autoimmune multiorgan syndrome): clinical presentations and pathogenesis. *Dermatol Clin* 29, 419–425
67. Funakoshi T, Lunardon L, Ellebrecht CT, Nagler AR, O’Leary CE, Payne AS (2012) Enrichment of total serum IgG4 in patients with pemphigus. *Br J Dermatol* 167, 1245–1253
68. Gammon WR, Merritt CC, Lewis DM, Sams WM, Carlo JR, Wheeler CE (1982) An in vitro model of immune complex-mediated basement membrane zone separation caused by pemphigoid antibodies, leukocytes, and complement. *J Invest Dermatol* 78, 285–290
69. Gawkrödger DJ, Blackwell JN, Gilmour HM, Rifkind EA, Heading RC, Barnetson RS (1984) Dermatitis herpetiformis: diagnosis, diet and demography. *Gut* 25, 151–157
70. Georgi M, Jainta S, Bröcker EB, Zillikens D (2001) Autoantigens of subepidermal bullous autoimmune dermatoses. *Hautarzt* 52, 1079–1089
71. Giudice GJ, Emery DJ, Zelickson BD, Anhalt GJ, Liu Z, Diaz LA (1993) Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Immunol* 151, 5742–5750
72. Goldblatt F, Gordon TP (2002) Antibodies to blood group antigens mimic pemphigus staining patterns: a useful reminder. *Autoimmunity* 35, 93–96
73. Goletz S, Hashimoto T, Zillikens D, Schmidt E (2014) Anti-p200 pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 71, 7
74. Goletz S, Probst C, Komorowski L, Schlumberger W, van Beek N, Holtsche MM, Recke A, Yancey KB, Hashimoto T, Antonicelli F, Di Zenzo G, Zillikens D, Stöcker W, Schmidt E. Sensitive and specific assay for the serological diagnosis of anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid. *Br J Dermatol*. In Press.
75. Goletz S, Zillikens D, Schmidt E (2017) Structural proteins of the dermal-epidermal junction targeted by autoantibodies in pemphigoid diseases. *Exp Dermatol* 26, 1154–1162
76. Gornowicz-Porowska J, Bowszyc-Dmochowska M, Seraszek-Jaros A, Kaczmarek E, Dmochowski M (2012) Association between levels of IgA antibodies to tissue transglutaminase and gliadin-related nonapeptides in dermatitis herpetiformis. *ScientificWorldJournal* 2012, e363296
77. Grob P, Inderbitzin T (1967) Pemphigus Antigen and Blood Group Substances A and B. *J Invest Dermatol* 49, 285–287
78. Groth S, Recke A, Vafia K, Ludwig RJ, Hashimoto T, Zillikens D, Schmidt E (2011) Development of a simple enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of autoantibodies in anti-p200 pemphigoid. *Br J Dermatol* 164, 76–82

79. Gudi VS, White MI, Cruickshank N, Herriot R, Edwards SL, Nimmo F, Ormerod AD (2005) Annual incidence and mortality of bullous pemphigoid in the Grampian Region of North-east Scotland. *Br J Dermatol* 153, 424–427
80. Gushi M, Yamamoto Y-I, Mine Y, Awazawa R, Nonaka K, Taira K, Asato Y, Hagiwara K, Uezato H (2008) Neonatal pemphigus vulgaris. *J Dermatol* 35, 529–535
81. Hahn-Ristic K, Rzany B, Amagai M, Bröcker EB, Zillikens D (2002) Increased incidence of pemphigus vulgaris in southern Europeans living in Germany compared with native Germans. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV* 16, 68–71
82. Hammers CM, Stanley JR (2016) Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 11, 175–197
83. Harman KE, Seed PT, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM (2001) The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. *Br J Dermatol* 144, 775–780
84. Hashimoto K, Hashimoto T, Higashiyama M, Nishikawa T, Garrod DR, Yoshikawa K (1994) Detection of anti-desmocollins I and II autoantibodies in two cases of Hallopeau type pemphigus vegetans by immunoblot analysis. *J Dermatol Sci* 7, 100–106
85. Hashimoto T, Amagai M, Watanabe K, Chorzelski TP, Bhogal BS, Black MM, Stevens HP, Boorsma DM, Korman NJ, Gamou S (1995) Characterization of paraneoplastic pemphigus autoantigens by immunoblot analysis. *J Invest Dermatol* 104, 829–834
86. Hashimoto T, Amagai M, Watanabe K, Dmochowski M, Chidgey MAJ, Yue KKM, Garrod DR, Nishikawa T (1995) A case of pemphigus vulgaris showing reactivity with pemphigus antigens (Dsg1 and Dsg3) and desmocollins. *J Invest Dermatol* 104, 541–544
87. Hashimoto T, Kiyokawa C, Mori O, Miyasato M, Chidgey MAJ, Garrod DR, Kobayashi Y, Komori K, Ishii K, Amagai M, Nishikawa T (1997) Human desmocollin 1 (Dsc1) is an autoantigen for the subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus. *J Invest Dermatol* 109, 127–131
88. Hashimoto T, Ogawa MM, Konohana A, Nishikawa T (1990) Detection of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antigens by immunoblot analysis using different antigen sources. *J Invest Dermatol* 94, 327–331
89. Heine KG, Kumar A, Jordon RE (1977) Pemphigus-like antibodies in bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 113, 1693–1695
90. Helou J, Allbritton J, Anhalt GJ (1995) Accuracy of indirect immunofluorescence testing in the diagnosis of paraneoplastic pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 32, 441–447
91. Hervonen K, Karell K, Holopainen P, Collin P, Partanen J, Reunala T (2000) Concordance of dermatitis herpetiformis and celiac disease in monozygous twins. *J Invest Dermatol* 115, 990–993

92. Heupel W-M, Zillikens D, Drenckhahn D, Waschke J (2008) Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *J Immunol* 181, 1825–1834
93. Hisamatsu Y, Amagai M, Garrod DR, Kanzaki T, Hashimoto T (2004) The detection of IgG and IgA autoantibodies to desmocollins 1-3 by enzyme-linked immunosorbent assays using baculovirus-expressed proteins, in atypical pemphigus but not in typical pemphigus. *Br J Dermatol* 151, 73–83
94. Hofmann S, Thoma-Uszynski S, Hunziker T, Bernard P, Koebrick C, Stauber A, Schuler G, Borradori L, Hertl M (2002) Severity and phenotype of bullous pemphigoid relate to autoantibody profile against the NH₂- and COOH-terminal regions of the BP180 ectodomain. *J Invest Dermatol* 119, 1065–1073
95. Ikai K, Imamura S (1976) Pemphigus-like antibodies in dermatitis herpetiformis. *Dermatologica* 152, 304–308
96. Ishii K, Amagai M, Hall RP, Hashimoto T, Takayanagi A, Gamou S, Shimizu N, Nishikawa T (1997) Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *J Immunol* 159, 2010–2017
97. Ishii N, Teye K, Fukuda S, Uehara R, Hachiya T, Koga H, Tsuchisaka A, Numata S, Ohyama B, Tateishi C, Tsuruta D, Furumura M, Hattori S, Kawakami T, Ohata C, Hashimoto T (2015) Anti-desmocollin autoantibodies in nonclassical pemphigus. *Br J Dermatol* 173, 59–68
98. Iwata H, Hiramitsu Y, Aoyama Y, Kitajima Y (2009) A case of anti-p200 pemphigoid: evidence for a different pathway in neutrophil recruitment compared with bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 160, 462–464
99. Iwata H, Kamio N, Aoyama Y, Yamamoto Y, Hirako Y, Owaribe K, Kitajima Y (2009) IgG from patients with bullous pemphigoid depletes cultured keratinocytes of the 180-kDa bullous pemphigoid antigen (type XVII collagen) and weakens cell attachment. *J Invest Dermatol* 129, 919–926
100. Joly P, Baricault S, Sparsa A, Bernard P, Bédane C, Duvert-Lehembre S, Courville P, Bravard P, Rémond B, Doffoel-Hantz V, Bénichou J (2012) Incidence and mortality of bullous pemphigoid in France. *J Invest Dermatol* 132, 1998–2004
101. Joly P, Richard C, Gilbert D, Courville P, Chosidow O, Roujeau JC, Beylot-Barry M, D'incan M, Martel P, Lauret P, Tron F (2000) Sensitivity and specificity of clinical, histologic, and immunologic features in the diagnosis of paraneoplastic pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 43, 619–626
102. Jung M, Kippes W, Messer G, Zillikens D, Rzany B (1999) Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence. *J Am Acad Dermatol* 41, 266–268
103. Kaminaka C, Kanazawa N, Furukawa F, Hashimoto T (2010) Case of anti-laminin-gamma1 pemphigoid associated with psoriatic erythroderma. *J Dermatol* 37, 272–275

104. Kamiya K, Aoyama Y, Wakashima C, Kudo T, Nakajima K, Sano S, Ishii N, Teye K, Hashimoto T, Iwatsuki K, Tokura Y (2016) Atypical pemphigus with immunoglobulin G autoantibodies against desmoglein 3 and desmocollin 3. *J Dermatol* 43, 429–431
105. Kanwar A, De D (2011) Pemphigus in India. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 77, 439
106. Kelly SE, Wojnarowska F (1988) The use of chemically split tissue in the detection of circulating anti-basement membrane zone antibodies in bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid. *Br J Dermatol* 118, 31–40
107. Kirtschig G, Marinkovich MP, Burgeson RE, Yancey KB (1995) Anti-basement membrane autoantibodies in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid bind the alpha subunit of laminin 5. *J Invest Dermatol* 105, 543–548
108. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Nishikawa T (2002) BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 30, 224–232
109. Koch PJ, Goldschmidt MD, Walsh MJ, Zimbelmann R, Schmelz M, Franke WW (1991) Amino acid sequence of bovine muzzle epithelial desmocollin derived from cloned cDNA: a novel subtype of desmosomal cadherins. *Differ Res Biol Divers* 47, 29–36
110. Koga H, Ishii N, Dainichi T, Tsuruta D, Hamada T, Ohata C, Karashima T, Furumura M, Hashimoto T (2013) An attempt to develop mouse model for anti-laminin $\gamma 1$ pemphigoid. *J Dermatol Sci* 70, 108–115
111. Komorowski L, Müller R, Vorobyev A, Probst C, Recke A, Jonkman MF, Hashimoto T, Kim S-C, Groves R, Ludwig RJ, Zillikens D, Stöcker W, Schmidt E (2013) Sensitive and specific assays for routine serological diagnosis of epidermolysis bullosa acquisita. *J Am Acad Dermatol* 68, 89–95
112. Kowalczyk AP, Borgwardt JE, Green KJ (1996) Analysis of Desmosomal Cadherin–Adhesive Function and Stoichiometry of Desmosomal Cadherin–Plakoglobin Complexes. *J Invest Dermatol* 107, 293–300
113. Kromminga A, Scheckenbach C, Georgi M, Hagel C, Arndt R, Christophers E, Bröcker EB, Zillikens D (2000) Patients with bullous pemphigoid and linear IgA disease show a dual IgA and IgG autoimmune response to BP180. *J Autoimmun* 15, 293–300
114. Kromminga A, Sitaru C, Hagel C, Herzog S, Zillikens D (2004) Development of an ELISA for the detection of autoantibodies to BP230. *Clin Immunol Orlando Fla* 111, 146–152
115. Kumar V, Beutner EH, Chorzelski TP (1987) Antiendomysial antibody—useful serological indicator of dermatitis herpetiformis. *Arch Dermatol Res* 279, 454–458
116. Künzli K, Favre B, Chofflon M, Borradori L (2016) One gene but different proteins and diseases: the complexity of dystonin and bullous pemphigoid antigen 1. *Exp Dermatol* 25, 10–16

117. Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, Mutasim DF, Diaz LA (1986) Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. *J Immunol* 136, 1231–1235
118. Laffitte E, Burkhard PR, Fontao L, Jaunin F, Saurat J-H, Chofflon M, Borradori L (2005) Bullous pemphigoid antigen 1 isoforms: potential new target autoantigens in multiple sclerosis? *Br J Dermatol* 152, 537–540
119. Lai YC, Yew YW, Lambert WC (2016) Bullous pemphigoid and its association with neurological diseases: a systematic review and meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV* 30, 2007–2015
120. Langan SM, Groves RW, West J (2011) The relationship between neurological disease and bullous pemphigoid: a population-based case-control study. *J Invest Dermatol* 131, 631–636
121. Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJP, West J (2008) Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris-incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *Br Med J* 337, 160–163
122. Lazarova Z, Salato VK, Lanschuetzer CM, Janson M, Fairley JA, Yancey KB (2008) IgG anti-laminin-332 autoantibodies are present in a subset of patients with mucous membrane, but not bullous, pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 58, 951–958
123. Lee FJ, Silvestrini R, Fulcher DA (2010) False-positive intercellular cement substance antibodies due to group A/B red cell antibodies: frequency and approach. *Pathology (Phila)* 42, 574–577
124. Leverkus M, Schmidt E, Lazarova Z, Bröcker EB, Yancey KB, Zillikens D (1999) Antiepiligrin cicatricial pemphigoid: an underdiagnosed entity within the spectrum of scarring autoimmune subepidermal bullous diseases? *Arch Dermatol* 135, 1091–1098
125. Li J, Bu D, Huang Y, Zhu X (2009) Role of autoantibodies against the linker subdomains of envoplakin and periplakin in the pathogenesis of paraneoplastic pemphigus. *Chin Med J (Engl)* 122, 486–495
126. Li W, Zhao X, Shi R, Wang X, Zheng J (2011) False-positive intercellular indirect immunofluorescence test due to anti-blood group antibodies in a patient with epidermolysis bullosa acquisita. *Int J Dermatol* 50, 462–466
127. Lin L, Bankaitis E, Heimbach L, Li N, Abrink M, Pejler G, An L, Diaz LA, Werb Z, Liu Z (2011) Dual targets for mouse mast cell protease-4 in mediating tissue damage in experimental bullous pemphigoid. *J Biol Chem* 286, 37358–37367
128. Lindelöf B, Islam N, Eklund G, Arfors L (1990) Pemphigoid and cancer. *Arch Dermatol* 126, 66–68
129. Liu Q, Bu D-F, Li D, Zhu X-J (2008) Genotyping of HLA-I and HLA-II alleles in Chinese patients with paraneoplastic pemphigus. *Br J Dermatol* 158, 587–591
130. Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, Giudice GJ (1993) A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest* 92, 2480–2488

131. Liu Z, Zhou X, Shapiro SD, Shipley JM, Twining SS, Diaz LA, Senior RM, Werb Z (2000) The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. *Cell* 102, 647–655
132. Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR (1999) Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest* 103, 461–468
133. Mao X, Nagler AR, Farber SA, Choi EJ, Jackson LH, Leiferman KM, Ishii N, Hashimoto T, Amagai M, Zone JJ, Payne AS (2010) Autoimmunity to Desmocollin 3 in Pemphigus Vulgaris. *Am J Pathol* 177, 2724–2730
134. Marazza G, Pham HC, Schärer L, Pedrazzetti PP, Hunziker T, Trüeb RM, Hohl D, Itin P, Lautenschlager S, Naldi L, Borradori L, Autoimmune bullous disease Swiss study group (2009) Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study. *Br J Dermatol* 161, 861–868
135. Marinkovich MP, Taylor TB, Keene DR, Burgeson RE, Zone JJ (1996) 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
136. Martel P, Loiseau P, Joly P, Busson M, Lepage V, Mouquet H, Courville P, Flageul B, Charron D, Musette P, Gilbert D, Tron F (2003) Paraneoplastic pemphigus is associated with the DRB1*03 allele. *J Autoimmun* 20, 91–95
137. Matsushima S, Horiguchi Y, Honda T, Fujii S, Okano T, Tanabe M, Wakayama T, Hashimoto T, Yancey KB (2004) A case of anti-epiligrin cicatricial pemphigoid associated with lung carcinoma and severe laryngeal stenosis: review of Japanese cases and evaluation of risk for internal malignancy. *J Dermatol* 31, 10–15
138. McCarty M, Zillikens D, Fivenson D (2015) Anti-p200 pemphigoid (anti-laminin-γ1 pemphigoid) demonstrating pathergy. *Int J Womens Dermatol* 1, 173–174
139. Messingham KN, Wang JW, Holahan HM, Srikantha R, Aust SC, Fairley JA (2016) Eosinophil localization to the basement membrane zone is autoantibody- and complement-dependent in a human cryosection model of bullous pemphigoid. *Exp Dermatol* 25, 50–55
140. Mindorf S, Dettmann IM, Krüger S, Fuhrmann T, Rentzsch K, Karl I, Probst C, Komorowski L, Fechner K, van Beek N, Lemcke S, Sárdy M, Bangert C, Benoit S, Hashimoto T, Zillikens D, Pas HH, Jonkman MF, Stöcker W, Schmidt E, International Autoimmune Bullous Diseases Study Group (2017) Routine detection of serum antidesmocollin autoantibodies is only useful in patients with atypical pemphigus. *Exp Dermatol* 26, 1267–1270
141. Mitsuya J, Hara H, Ito K, Ishii N, Hashimoto T, Terui T (2008) Metastatic ovarian carcinoma-associated subepidermal blistering disease with autoantibodies to both the p200 dermal antigen and the gamma 2 subunit of laminin 5 showing unusual clinical features. *Br J Dermatol* 158, 1354–1357
142. Mobacken H, Kastrup W, Nilsson LA (1984) Incidence and prevalence of dermatitis herpetiformis in western Sweden. *Acta Derm Venereol* 64, 400–404
143. Monshi B, Groth S, Richter L, Schmidt E, Zillikens D, Rappersberger K (2012) A long-term study of a patient with anti-p200 pemphigoid: correlation of autoantibody

- levels with disease activity and an example of epitope spreading. *Br J Dermatol* 167, 1179–1183
144. Müller R, Heber B, Hashimoto T, Messer G, Müllegger R, Niedermeier A, Hertl M (2009) Autoantibodies against desmocollins in European patients with pemphigus. *Clin Exp Dermatol* 34, 898–903
145. Nagata Y, Karashima T, Watt FM, Salmhofer W, Kanzaki T, Hashimoto T (2001) Paraneoplastic pemphigus sera react strongly with multiple epitopes on the various regions of envoplakin and periplakin, except for the c-terminal homologous domain of periplakin. *J Invest Dermatol* 116, 556–563
146. Nikolskaia OV, Noursari CH, Anhalt GJ (2003) Paraneoplastic pemphigus in association with Castleman's disease. *Br J Dermatol* 149, 1143–1151
147. Ohzono A, Sogame R, Li X, Teye K, Tsuchisaka A, Numata S, Koga H, Kawakami T, Tsuruta D, Ishii N, Hashimoto T (2015) Clinical and immunological findings in 104 cases of paraneoplastic pemphigus. *Br J Dermatol* 173, 1447–1452
148. Oursler JR, Labib RS, Ariss-Abdo L, Burke T, O'Keefe EJ, Anhalt GJ (1992) Human autoantibodies against desmoplakins in paraneoplastic pemphigus. *J Clin Invest* 89, 1775–1782
149. Oursler JR, Labib RS, Ariss-Abdo L, Burke T, O'Keefe EJ, Anhalt GJ (1992) Human autoantibodies against desmoplakins in paraneoplastic pemphigus. *J Clin Invest* 89, 1775–1782
150. Oyama N, Setterfield JF, Powell AM, Sakuma-Oyama Y, Albert S, Bhogal BS, Vaughan RW, Kaneko F, Challacombe SJ, Black MM (2006) 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
151. Peck SM, Osserman KE, Rule AH (1972) Intercellular antibodies: presence in a *Trichophyton rubrum* infection. *J Invest Dermatol* 58, 133–138
152. Perriard J, Jaunin F, Favre B, Büdinger L, Hertl M, Saurat JH, Borradori L (1999) IgG autoantibodies from bullous pemphigoid (BP) patients bind antigenic sites on both the extracellular and the intracellular domains of the BP antigen 180. *J Invest Dermatol* 112, 141–147
153. Probst C, Schlumberger W, Stöcker W, Recke A, Schmidt E, Hashimoto T, Zhu XJ, Zillikens D, Komorowski L (2009) Development of ELISA for the specific determination of autoantibodies against envoplakin and periplakin in paraneoplastic pemphigus. *Clin Chim Acta* 410, 13–18
154. Proost S, Schlumberger W, Meyer W, Dähnrich C, Müller-Kunert E, Sonnenberg K, Stöcker W (1996) EUROPLUS - Eine BIOCHIP-Kombination aus Gewebeschnitten und Einzelantigenen für die indirekte Immunfluoreszenz: Endomysium/Gliadin, AMA/M2 und Parietalzellen/intrinsic Faktor. *J Lab Med* 20, 638–689
155. Prost-Squarcioni C, Caux F (2015) Epidermolysis Bullosa Acquisita. In: Murrell D: Blistering Diseases: Clinical Features, Pathogenesis, Treatment. 1. Aufl., 405–412, Springer, Heidelberg.

156. Prüßmann W, Prüßmann J, Koga H, Recke A, Iwata H, Juhl D, Görg S, Henschler R, Hashimoto T, Schmidt E, Zillikens D, Ibrahim SM, Ludwig RJ (2015) Prevalence of pemphigus and pemphigoid autoantibodies in the general population. *Orphanet J Rare Dis* 10, 63
157. Rafei D, Müller R, Ishii N, Llamazares M, Hashimoto T, Hertl M, Eming R (2011) IgG Autoantibodies Against Desmocollin 3 in Pemphigus Sera Induce Loss of Keratinocyte Adhesion. *Am J Pathol* 178, 718–723
158. Rashid KA, Gürcan HM, Ahmed AR (2006) Antigen specificity in subsets of mucous membrane pemphigoid. *J Invest Dermatol* 126, 2631–2636
159. Roenigk HH, Ryan JG, Bergfeld WF (1971) Epidermolysis bullosa acquisita. Report of three cases and review of all published cases. *Arch Dermatol* 103, 1–10
160. Roh JY, Yee C, Lazarova Z, Hall RP, Yancey KB (2000) The 120-kDa soluble ectodomain of type XVII collagen is recognized by autoantibodies in patients with pemphigoid and linear IgA dermatosis. *Br J Dermatol* 143, 104–111
161. Rose C, Armbruster FP, Ruppert J, Igl B-W, Zillikens D, Shimanovich I (2009) Autoantibodies against epidermal transglutaminase are a sensitive diagnostic marker in patients with dermatitis herpetiformis on a normal or gluten-free diet. *J Am Acad Dermatol* 61, 39–43
162. Rose E, Kasperkiewicz M, Rose C, Zillikens D (2007) Bullöse Autoimmundermatosen: Neues zur Diagnostik und Therapie. *Dtsch Dermatol* 9, 617–623
163. Roussel A, Benichou J, Randriamanantany ZA, Gilbert D, Drenovska K, Houivet E, Tron F, Joly P (2011) Enzyme-linked immunosorbent assay for the combination of bullous pemphigoid antigens 1 and 2 in the diagnosis of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 147, 293–298
164. Russo I, Saponeri A, Peserico A, Alaibac M (2014) The use of biochip immunofluorescence microscopy for the diagnosis of Pemphigus vulgaris. *Acta Histochem* 116, 713–716
165. Sardana K, Garg VK, Agarwal P (2013) Is there an emergent need to modify the desmoglein compensation theory in pemphigus on the basis of Dsg ELISA data and alternative pathogenic mechanisms? *Br J Dermatol* 168, 669–674
166. Sárdy M, Kárpáti S, Merkl B, Paulsson M, Smyth N (2002) Epidermal Transglutaminase (TGase 3) Is the Autoantigen of Dermatitis Herpetiformis. *J Exp Med* 195, 747–757
167. Schmidt E, Bröcker EB, Zillikens D (2000) Pemphigus. Loss of desmosomal cell-cell contact. *Hautarzt* 51, 309–318
168. Schmidt E, Dähnrich C, Rosemann A, Probst C, Komorowski L, Saschenbrecker S, Schlumberger W, Stöcker W, Hashimoto T, Bröcker E-B, Recke A, Rose C, Zillikens D (2010) Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3: correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients. *Exp Dermatol* 19, 458–463

169. Schmidt E, Goebeler M, Hertl M, Sárdy M, Sitaru C, Eming R, Hofmann SC, Hunzelmann N, Kern JS, Kramer H, Orzechowski H-D, Pfeiffer C, Schuster V, Sporbeck B, Sticherling M, Worm M, Zillikens D, Nast A (2015) S2k guideline for the diagnosis of pemphigus vulgaris/foliaceus and bullous pemphigoid: Diagnosis of pemphigus and bullous pemphigoid. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges* 13, 713–727
170. Schmidt E, Kromminga A, Mimietz S, Leinfelder U, Sitaru C, Bröcker E-B, Zillikens D, Zimmermann U (2002) A highly sensitive and simple assay for the detection of circulating autoantibodies against full-length bullous pemphigoid antigen 180. *J Autoimmun* 18, 299–309
171. Schmidt E, Obe K, Bröcker EB, Zillikens D (2000) Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 136, 174–178
172. Schmidt E, Reimer S, Kruse N, Jainta S, Bröcker EB, Marinkovich MP, Giudice GJ, Zillikens D (2000) Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 115, 842–848
173. Schmidt E, Skrobek C, Kromminga A, Hashimoto T, Messer G, Bröcker EB, Yancey KB, Zillikens D (2001) Cicatricial pemphigoid: IgA and IgG autoantibodies target epitopes on both intra- and extracellular domains of bullous pemphigoid antigen 180. *Br J Dermatol* 145, 778–783
174. Schmidt E, della Torre R, Borradori L (2011) Clinical Features and Practical Diagnosis of Bullous Pemphigoid. *Dermatol Clin* 29, 427–438
175. Schmidt E, Zillikens D (2009) Research in practice: diagnosis of subepidermal autoimmune bullous disorders. *J Dtsch Dermatol Ges* 7, 296–300
176. Schmidt E, Zillikens D (2010) Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. *Autoimmun Rev* 10, 84–89
177. Schmidt E, Zillikens D (2011) Diagnostik und Therapie bullöser Autoimmundermatosen. *Dtsch Ärztebl* 108, 399–408
178. Schmidt E, Zillikens D (2011) Diagnosis and Treatment of Patients with Autoimmune Bullous Disorders in Germany. *Dermatol Clin* 29, 663–671
179. Schmidt E, Zillikens D (2013) Pemphigoid diseases. *Lancet* 381, 320–332
180. Schulze F, Kasperkiewicz M, Zillikens D, Schmidt E (2013) Bullöses Pemphigoid. *Hautarzt* 64, 931–945
181. Seppänen A, Miettinen R, Alafuzoff I (2010) Neuronal collagen XVII is localized to lipofuscin granules. *Neuroreport* 21, 1090–1094
182. Sharma VK, Prasad HRY, Khandpur S, Kumar A (2006) Evaluation of desmoglein enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in Indian patients with pemphigus vulgaris. *Int J Dermatol* 45, 518–522
183. Sitaru C, Chiriac MT, Mihai S, Büning J, Gebert A, Ishiko A, Zillikens D (2006) Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice. *J Immunol* 177, 3461–3468

184. Sitaru C, Dähnrich C, Probst C, Komorowski L, Blöcker I, Schmidt E, Schlumberger W, Rose C, Stöcker W, Zillikens D (2007) 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
185. Sitaru C, Goebeler M, Zillikens D (2004) Bullöse Autoimmundermatosen (I): Pathogenese und Diagnostik. *J Dtsch Dermatol Ges* 2, 123–138
186. Sitaru C, Schmidt E, Petermann S, Munteanu LS, Bröcker E-B, Zillikens D (2002) Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *J Invest Dermatol* 118, 664–671
187. Sitaru C, Zillikens D (2005) Mechanisms of blister induction by autoantibodies. *Exp Dermatol* 14, 861–875
188. Smith EP, Taylor TB, Meyer LJ, Zone JJ (1993) Identification of a basement membrane zone antigen reactive with circulating IgA antibody in ocular cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol* 101, 619–623
189. Spaeth S, Riechers R, Borradori L, Zillikens D, Büdinger L, Hertl M (2001) IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of desmoglein 3 in active pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 144, 1183–1188
190. Spindler V, Heupel W-M, Efthymiadis A, Schmidt E, Eming R, Rankl C, Hinterdorfer P, Muller T, Drenckhahn D, Waschke J (2009) Desmocollin 3-mediated Binding Is Crucial for Keratinocyte Cohesion and Is Impaired in Pemphigus. *J Biol Chem* 284, 30556–30564
191. Stanley JR, Hawley-Nelson P, Yuspa SH, Shevach EM, Katz SI (1981) Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell* 24, 897–903
192. Stöcker W (2012) Autoantikörper bei bullösen Autoimmundermatosen. In: Gressner AM, Arndt T: *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2. Aufl., 140-143, Springer, Heidelberg.
193. Stöcker W, Horbach E, Slenczka W, Schaper J, Böttger K, Herrmann C (1989) Automatische Bestückung von Objektträgern mit Biochips: Eine neue Technologie für die indirekte Immunfluoreszenz. *Lab Med* 13, 171–172
194. Stöcker W, Rateike M, Morrin M (2005) Method for producing solid-phase bonded bioreagents. Assignee: Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG. Patentnummer: WO2005073693A1.
195. Syed S-H, Trinnaman B, Martin S, Major S, Hutchinson J, Magee AI (2002) Molecular interactions between desmosomal cadherins. *Biochem J* 362, 317–327
196. Taghipour K, Chi C-C, Vincent A, Groves RW, Venning V, Wojnarowska F (2010) The association of bullous pemphigoid with cerebrovascular disease and dementia: a case-control study. *Arch Dermatol* 146, 1251–1254
197. Tampoia M, Zucano A, Villalta D, Antico A, Bizzaro N (2012) Anti-skin specific autoantibodies detected by a new immunofluorescence multiplex biochip method in patients with autoimmune bullous diseases. *Dermatology* 225, 37–44

198. Tateishi C, Tsuruta D, Nakanishi T, Uehara S, Kobayashi H, Ishii M, Hashimoto T (2010) Antidesmocollin-1 antibody-positive, antidesmoglein antibody-negative pemphigus herpetiformis. *J Am Acad Dermatol* 63, 8–10
199. Taylor G, Venning V, Wojnarowska F, Welch K (1993) Bullous pemphigoid and autoimmunity. *J Am Acad Dermatol* 29, 181–184
200. Thorne JE, Anhalt GJ, Jabs DA (2004) Mucous membrane pemphigoid and pseudopemphigoid. *Ophthalmology* 111, 45–52
201. Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, Koyasu S, Nishikawa T, Amagai M (2003) Induction of Pemphigus Phenotype by a Mouse Monoclonal Antibody Against the Amino-Terminal Adhesive Interface of Desmoglein 3. *J Immunol* 170, 2170–2178
202. Vafia K, Groth S, Beckmann T, Hirose M, Dworschak J, Recke A, Ludwig RJ, Hashimoto T, Zillikens D, Schmidt E (2012) Pathogenicity of autoantibodies in anti-p200 pemphigoid. *PLoS One* 7, e41769
203. Van Weemen BK, Schuurs AHWM (1971) Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett* 15, 232–236
204. Vorobyev A, Hammers CM, Zillikens D, Schmidt E (2015) Bullöse Autoimmundermatosen - Moderne serologische Testverfahren ermöglichen genaue Diagnose. *Dtsch Dermatol* 63, 738–745
205. Waschke J (2008) The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol* 130, 21–54
206. Wong SN, Chua SH (2002) Spectrum of subepidermal immunobullous disorders seen at the National Skin Centre, Singapore: a 2-year review. *Br J Dermatol* 147, 476–480
207. Woodley DT, Burgeson RE, Lunstrum G, Bruckner-Tuderman L, Reese MJ, Briggaman RA (1988) Epidermolysis bullosa acquisita antigen is the globular carboxyl terminus of type VII procollagen. *J Clin Invest* 81, 683–687
208. Wozniak K, Hashimoto T, Fukuda S, Ohyama B, Ishii N, Koga H, Dainichi T, Kowalewski C (2011) IgA anti-p200 pemphigoid. *Arch Dermatol* 147, 1306–1310
209. Wozniak K, Kowalewski C, Hashimoto T, Ishii N, Glinska-Wielochowska M, Schwartz RA (2006) Penicillin-induced anti-p200 pemphigoid: an unusual morphology. *Acta Derm Venereol* 86, 443–446
210. Yoshida M, Hamada T, Amagai M, Hashimoto K, Uehara R, Yamaguchi K, Imamura K, Okamoto E, Yasumoto S, Hashimoto T (2006) Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 41, 21–30
211. Zarian H, Saponeri A, Michelotto A, Zattra E, Belloni-Fortina A, Alaibac M, Zarian H, Saponeri A, Michelotto A, Zattra E, Belloni-Fortina A, Alaibac M (2012) Biochip Technology for the Serological Diagnosis of Bullous Pemphigoid. *Int Sch Res Not* 2012, e237802

212. Zhang B, Zheng R, Wang J, Bu D, Zhu X (2006) Epitopes in the linker subdomain region of envoplakin recognized by autoantibodies in paraneoplastic pemphigus patients. *J Invest Dermatol* 126, 832–840
213. Zillikens D (2005) Bullöse Autoimmundermatosen. In: Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf W, Landthaler M: *Dermatologie und Venerologie*. 5. Aufl., 607–638, Springer, Heidelberg.
214. Zillikens D, Herzele K, Georgi M, Schmidt E, Chimanovitch I, Schumann H, Mascaro JM, Diaz LA, Bruckner-Tuderman L, Bröcker EB, Giudice GJ (1999) Autoantibodies in a subgroup of patients with linear IgA disease react with the NC16A domain of BP1801. *J Invest Dermatol* 113, 947–953
215. Zillikens D, Kawahara Y, Ishiko A, Shimizu H, Mayer J, Rank CV, Liu Z, Giudice GJ, Tran HH, Marinkovich MP, Brocker EB, Hashimoto T (1996) A novel subepidermal blistering disease with autoantibodies to a 200-kDa antigen of the basement membrane zone. *J Invest Dermatol* 106, 1333–1338
216. Zillikens D, Mascaro JM, Rose PA, Liu Z, Ewing SM, Caux F, Hoffmann RG, Diaz LA, Giudice GJ (1997) A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 109, 679–683
217. Zillikens D, Rose PA, Balding SD, Liu Z, Olague-Marchan M, Diaz LA, Giudice GJ (1997) Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. *J Invest Dermatol* 109, 573–579
218. Zillikens D, Wever S, Roth A, Weidenthaler-Barth B, Hashimoto T, Bröcker EB (1995) Incidence of autoimmune subepidermal blistering dermatoses in a region of central Germany. *Arch Dermatol* 131, 957–958
219. Zimmermann J, Bahmer F, Rose C, Zillikens D, Schmidt E (2010) Clinical and immunopathological spectrum of paraneoplastic pemphigus. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges* 8, 598–605

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AB-Puffer	Absorptionspuffer
AK	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata
BB	Blasenboden
BD	Blasendach
BM	Basalmembran
BP	Bullöses Pemphigoid
BP180	180kDa großes Bullöses-Pemphigoid-Antigen
BP180-NC16A-4X	Tetramer der 16. nicht-kollagenen Domäne des 180kDa großen Bullösen-Pemphigoid-Antigens
BP230	230kDa großes Bullöses-Pemphigoid-Antigen
BP230-gC	C-terminale globuläre Domäne des 230kDa großen Bullösen-Pemphigoid-Antigens
BPAG1	Bullöses Pemphigoid Antigen 1
BPAG2	Bullöses Pemphigoid Antigen 2
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ⁺	Calcium
DEJ	Dermo-epidermale Junktionszone
DH	Dermatitis herpetiformis
DIF	Direkte Immunfluoreszenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
Dsc1	Desmocollin 1
Dsc2	Desmocollin 2
Dsc3	Desmocollin 3
Dsg1	Desmoglein 1
Dsg3	Desmoglein 3

EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAF3x	Gliadin-analoges Fusionspeptid
ICR	Interzellularraum
IgA	Immunglobulin der Klasse A
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IgG	Immunglobulin der Klasse G, Subtyp 1-4
IgG ₄	Immunglobulin der Klasse G, Subtyp 4
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
LAD	Lineare IgA-Dermatose
LAD-1	Lineare IgA-Dermatose Antigen 1
LIED	Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie
M	molar
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase 9
NaCl	Natrium-Chlorid
Nr.	Nummer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PF	Pemphigus foliaceus
PNP	Paraneoplastischer Pemphigus
PV	Pemphigus vulgaris
SHP	Schleimhautpemphigoid
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

7.2 Abbildungen

Data Form Prospective multicentre European study on the validation of biomarkers for autoimmune bullous disorders For any serum with positive direct IF microscopy to be analysed centrally <i>to be filled out by the physician</i>							
Stamp of the centre signed informed consent yes ☐ no ☐ date of blood sample _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ date of positive direct IF microscopy _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ direct immunofluorescence microscopy ☐ C3 ☐ IgG ☐ IgA ☐ negative ☐ along the basal membrane zone ☐ in the epithelium (intercellular pattern) data in this field are compulsory	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">Patient number</td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Please number chronologically </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Date of birth</td> <td style="padding: 5px;"> Month Year </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Gender</td> <td style="padding: 5px;"> male ☐ female ☐ </td> </tr> </table> diagnosis ☐ bullous pemphigoid ☐ mucous membrane pemphigoid ☐ pemphigus vulgaris ☐ pemphigus foliaceus ☐ .. Clinic numbers of lesions ☐ not known ☐ <3 ☐ 3-5 ☐ 6-10 ☐ >10 PDAI score ABSIS score predominantly mucous membrane lesions? ☐ yes ☐ no ☐ oral ☐ nasal ☐ genital ☐ perianal ☐ conjunctival histopathology ☐ not done ☐ compatible with bullous/ mucous membrane pemphigoid ☐ compatible with pemphigus	Patient number	Please number chronologically	Date of birth	Month Year	Gender	male ☐ female ☐
Patient number	Please number chronologically						
Date of birth	Month Year						
Gender	male ☐ female ☐						

please turn page

Contact: Enno Schmidt, MD, PhD, mail: enno.schmidt@uk-sh.de, Tel+49 451 500 2538, Fax +49 451 500 2981

Version 2011-09-21

Abb. 7.1: Data Form der prospektiven multizentrischen Studie - Seite 1

Dieses Formblatt sollte von den Zentren für das jeweilige gesammelte Serum ausgefüllt und mit eingeschickt werden, um neben dem in der DIF positiven Befund weitere Daten über die Patienten zu erhalten. Zum Zeitpunkt der Namensgebung waren nur europäische Zentren beteiligt, daher wurde auf dem Data Form von europäischer Studie gesprochen.

Data Form Prospective multicentre European study on the validation of biomarkers for autoimmune bullous disorders For any serum with positive direct IF microscopy to be analysed centrally <i>to be filled out by the physician</i>																										
Serology by Biochip (Euroimmun) Salt-split skin Esophagus Desmoglein 1 Desmoglein 3 BP180 BP230 Laminin γ1 Type VII collagen ☐ not yet done ☐ epidermal binding ☐ dermal binding ☐ basal membrane pattern ☐ intercellular epithelium pattern ☐ positive ☐ positive ☐ positive ☐ positive ☐ positive ☐ positive ☐ positive ☐ positive ☐ positive ☐ negative ☐ negative ☐ negative ☐ negative ☐ negative ☐ negative ☐ negative ☐ negative ☐ negative ☐ negative																										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">Family History</th> <th style="width: 40%;">Country of birth</th> <th style="width: 30%;">unknown</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Patient</td><td></td><td style="text-align: center;">☐</td></tr> <tr><td>mother</td><td></td><td style="text-align: center;">☐</td></tr> <tr><td>mother oft the mother</td><td></td><td style="text-align: center;">☐</td></tr> <tr><td>father oft he mother</td><td></td><td style="text-align: center;">☐</td></tr> <tr><td>father</td><td></td><td style="text-align: center;">☐</td></tr> <tr><td>father of the father</td><td></td><td style="text-align: center;">☐</td></tr> <tr><td>mother of the father</td><td></td><td style="text-align: center;">☐</td></tr> </tbody> </table> Are there any blood relatives with known autoimmune dermatosis? yes ☐ no ☐ unknown ☐ if yes, please specify:			Family History	Country of birth	unknown	Patient		☐	mother		☐	mother oft the mother		☐	father oft he mother		☐	father		☐	father of the father		☐	mother of the father		☐
Family History	Country of birth	unknown																								
Patient		☐																								
mother		☐																								
mother oft the mother		☐																								
father oft he mother		☐																								
father		☐																								
father of the father		☐																								
mother of the father		☐																								

Please fill out the form and send it with

☐ serum (500 μ l) and

☐ EDTA blood (5 ml) to:

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Klinik für Dermatologie- Autoimmunlabor
Ratzeburger Allee 160
D-23538 Lübeck, Germany

Contact: Enno Schmidt, MD, PhD, mail: enno.schmidt@uk-sh.de, Tel +49 451 500 2538, Fax +49 451 500 2981

Version 2011-09-21

Abb. 7.2: Data Form der prospektiven multizentrischen Studie - Seite 2

Dieses Formblatt sollte von den Zentren für das jeweilige gesammelte Serum ausgefüllt und mit eingeschickt werden, um neben dem in der DIF positiven Befund weitere Daten über die Patienten zu erhalten. Die Zentren erhielten für die eigenständige Diagnostik mit der BIOCHIP™-Technologie das *Dermatologie Mosaik 7*, welches die Gewebe Primatenösophagus und –spalthaut, mit rekombinanten Antigen transfigierte Zellen für Desmoglein 1 und 3 und BP230 und BP180 als EUROPLUS® enthält. Angaben zu Laminin γ 1/p200 Protein und Kollagen Typ VII wurden nicht gemacht.

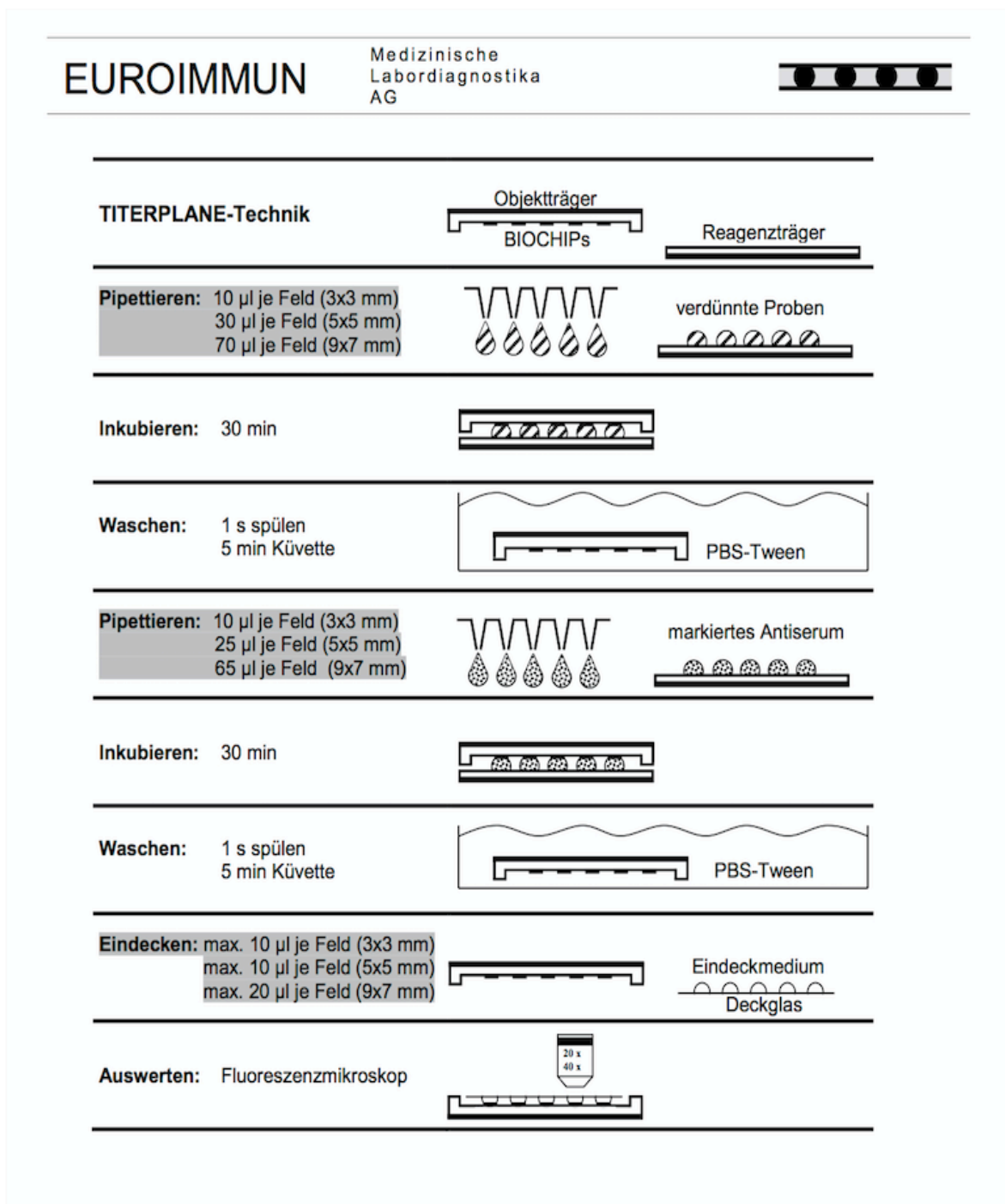


Abb. 7.3: EUROIMMUN Standardanleitung für den indirekten Immunfluoreszenztest

Bei der Inkubation der BIOCHIP™-Mosaik mit den Seren und anschließend dem Konjugat sowie bei dem Eindecken der Objektträger wurde nach diesem Protokoll für die TITERPLANE-Technik verfahren, um den gleichzeitigen Inkubationsstart aller zu einem Zeitpunkt getesteten Seren mit den BIOCHIPs™ zu ermöglichen. Pipettiert wurden die Seren und Konjugate auf die Reagenzträger nach den Angaben des Herstellers für ein 9mmx7mm großes Feld für das große Mosaik, für das Desmocollin-Mosaik nach den Angaben für ein 5mmx5mm großes Feld.

EUROIMMUN

Medizinische
Labordiagnostika
AG

Inkubation

Zusätzlich zu den Positiv- und Negativkontrollen sowie den Patientenproben verwendet man für die Durchführung eines qualitativen/semiquantitativen Tests den Kalibrator 2, für die Durchführung eines quantitativen Tests die Kalibratoren 1 bis 3.

Proben-Inkubation:
(1. Schritt)

Entsprechend dem Pipettierschema je 100 µl Kalibrator, Positiv- und Negativkontrolle oder verdünnte Patientenproben in die einzelnen Reagenzgefäße pipettieren. **30 Minuten** bei Raumtemperatur (+18 °C bis +25 °C) inkubieren.

Waschen:

Manuell: Reagenzgefäße entleeren und anschließend 3x mit jeweils 300 µl gebrauchsfertig verdünntem Waschpuffer waschen.

Automatisch: Reagenzgefäße entleeren und anschließend 3x mit je 450 µl gebrauchsfertig verdünntem Waschpuffer waschen (Programm-Einstellung: z. B. TECAN Columbus Washer „Overflow Modus“).

Den Waschpuffer in jedem Reagenzgefäß pro Waschzyklus 30-60 Sekunden einwirken lassen, anschließend absaugen oder ausschütten. Nach dem Waschvorgang sowohl bei manueller als auch automatischer Durchführung die Mikrotiterplatte mit den Öffnungen nach unten kräftig auf Fließpapier ausschlagen, um Waschpufferreste vollständig zu entfernen.

Achtung: Flüssigkeitsreste (>10 µl), die nach dem Waschvorgang in den Reagenzgefäßen verbleiben, können einen Einfluß auf die Substratumsatzung haben und zu falsch erniedrigten Extinktionswerten führen.

Unzureichendes Waschen (z. B. weniger als 3 Waschzyklen, zu geringe Waschpuffervolumina oder zu geringe Einwirkzeiten) kann zu falsch erhöhten Extinktionswerten führen.

Freie Positionen innerhalb des Mikrotiterstreifens sind mit leeren Reagenzgefäßen desselben Plattenformates wie das des zu untersuchenden Parameters aufzufüllen.

Konjugat-Inkubation:
(2. Schritt)

Jeweils 100 µl Enzymkonjugat-Lösung (Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgG) in die Reagenzgefäße pipettieren. **30 Minuten** bei Raumtemperatur (+18 °C bis +25 °C) inkubieren.

Waschen:

Reagenzgefäße entleeren. Waschen wie oben.

Substrat-Inkubation:
(3. Schritt)

Jeweils 100 µl Chromogen/Substrat-Lösung in die Reagenzgefäße pipettieren. **15 Minuten** bei Raumtemperatur (+18 °C bis +25 °C) inkubieren (vor direkter Sonneneinstrahlung schützen).

Stoppen:

Jeweils 100 µl Stopplösung in die Reagenzgefäße pipettieren, in der gleichen Reihenfolge und mit der gleichen Geschwindigkeit, wie bei der Zugabe der Chromogen/Substrat-Lösung.

Messen:

Die photometrische Auswertung der Farbintensität sollte innerhalb von **30 Minuten nach dem Stoppen** erfolgen, bei **450 nm Messwellenlänge** und einer Referenzwellenlänge zwischen 620 nm und 650 nm. Vor dem Messen die Mikrotiterplatte vorsichtig schütteln, um eine homogene Verteilung der Farblösung zu gewährleisten.

Abb. 7.4: Standardprotokoll des Herstellers zum Anti-BP180-NC16A-4X-ELISA (IgG)

Die Analyse der in der indirekten Immunfluoreszenz positiven Blutspender wurde mit dem ELISA Testsatz der EUROIMMUN AG nach Protokoll durchgeführt. Durchführungsschritte und Mengenangaben sind auf den Anti-Dsg3-ELISA (IgG) übertragbar.

Diagnose Pemphigus foliaceus	IgG						IgG/IgG ₄					
	Ösophagus ICR	Rattenblase	Leber (Serosa)	Desmoglein 1	Desmoglein 3	Leber (Gallengang)	Ösophagus ICR	Rattenblase	Leber (Serosa)	Desmoglein 1	Desmoglein 3	Leber (Gallengang)
Thessaloniki 007	100	0	0	320	0	0	320	0	0	320	0	0
Thessaloniki 009	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0
Thessaloniki 019	32	0	0	100	0	0	100	0	0	320	0	0
Thessaloniki 029	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Thessaloniki 033	320	0	0	320	0	0	1000	0	0	320	0	0
Thessaloniki 064	10	0	0	100	0	0	100	0	0	320	0	0
Thessaloniki 066	100	0	0	320	0	0	320	0	0	320	0	0
Thessaloniki 067	320	0	0	320	0	0	320	0	0	320	0	0
Rom 010	100	0	0	320	0	0	100	0	0	320	0	0
Rom 034	100	0	0	100	0	0	100	0	0	320	0	0
Antalya 020	320	0	0	320	0	0	320	0	0	320	0	0
Antalya 027	100	0	0	1000	0	0	100	0	0	1000	0	0
Belgrad 023	100	0	0	320	0	0	320	0	0	1000	0	0
Belgrad 034	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Belgrad 037	100	0	0	320	0	0	100	0	0	320	0	0
Belgrad 039	100	0	0	320	0	0	100	0	0	320	0	0
Belgrad 040	320	0	0	320	0	0	1000	0	0	320	0	0
Belgrad 044	100	0	0	10	0	0	100	0	0	32	0	0
Belgrad 068	320	0	0	320	0	0	320	0	0	320	0	0
	IgG ₄						IgG ₄ → IgG					
Thessaloniki 007	0	0	0	0	0	0	320	0	0	100	0	0
Thessaloniki 009	0	0	0	10	0	0	32	10	0	32	0	0
Thessaloniki 019	32	10	0	32	0	0	100	0	0	32	0	0
Thessaloniki 029	32	0	0	32	0	0	100	0	0	32	0	0
Thessaloniki 033	320	0	0	100	0	0	1000	0	0	320	0	0
Thessaloniki 064	100	0	0	32	0	0	100	0	0	100	0	0
Thessaloniki 066	100	0	0	320	0	0	100	10	0	320	0	0
Thessaloniki 067	320	0	0	100	0	0	320	0	0	100	0	0
Rom 010	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Rom 034	100	0	0	32	0	0	100	0	0	100	0	0
Antalya 020	320	0	0	100	0	0	320	0	0	320	0	0
Antalya 027	100	0	0	100	0	0	100	0	0	1000	0	0
Belgrad 023	100	0	0	100	0	0	320	0	0	1000	0	0
Belgrad 034	100	0	0	10	0	0	100	0	0	100	0	0
Belgrad 037	320	0	0	320	0	0	100	0	0	320	0	0
Belgrad 039	320	0	0	100	0	0	320	0	0	320	0	0
Belgrad 040	320	0	0	100	0	0	1000	0	0	1000	0	0
Belgrad 044	100	0	0	10	0	0	100	0	0	32	0	0
Belgrad 068	100	0	0	10	0	0	320	0	0	100	0	0

	IgG						IgG/IgG ₄					
Bern 003	320	0	0	1000	0	0	1000	0	0	1000	0	0
Bern 029	100	0	0	100	0	0	100	0	0	320	0	0
Sofia 009	1000	0	0	1000	0	0	3200	0	0	3200	0	0
Sofia 022	100	0	0	1000	0	0	320	0	0	1000	0	0
Sofia 023	320	0	0	100	0	0	320	0	0	100	0	0
Sofia 025	100	10	0	100	0	0	100	10	0	100	0	0
Sofia 027	1000	100	0	1000	0	0	3200	320	0	1000	0	0
Sofia 036	320	0	0	320	0	0	\	\	\	\	\	\
Sofia 037	1000	0	0	320	0	0	\	\	\	\	\	\
Sofia 043	100	0	0	320	0	0	100	0	0	320	0	0
Sofia 044	1000	0	0	1000	0	0	1000	0	0	1000	0	0
Sofia 046	320	0	0	1000	0	0	1000	0	0	3200	0	0
Sofia 048	320	0	0	1000	0	0	1000	0	0	1000	0	0
Sofia 049	100	0	0	32	0	0	100	0	0	32	0	0
Sofia 091	100	0	0	1000	0	0	100	0	0	1000	0	0
Sydney 014	320	0	0	3200	0	0	3200	0	0	3200	0	0
Posen 015	100	0	0	320	0	0	320	0	0	320	0	0
Posen 018	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Posen 033	100	0	0	100	0	0	320	0	0	100	0	0
Posen 045	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	0	0
Posen 053	100	0	0	32	0	0	320	0	0	100	0	0
Posen 060	320	0	0	3200	0	0	3200	0	0	3200	0	0
	IgG ₄						IgG ₄ → IgG					
Bern 003	1000	0	0	1000	0	0	1000	0	0	1000	0	0
Bern 029	100	0	0	32	0	0	100	0	0	320	0	0
Sofia 009	3200	0	0	1000	0	0	1000	0	0	3200	0	0
Sofia 022	320	0	0	100	0	0	1000	0	0	1000	0	0
Sofia 023	320	0	0	32	0	0	320	0	0	100	0	0
Sofia 025	32	0	0	10	0	0	100	0	0	10	0	0
Sofia 027	320	0	0	320	0	0	1000	100	0	1000	0	0
Sofia 036	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\
Sofia 037	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\
Sofia 043	10	0	0	10	0	0	100	0	0	100	0	0
Sofia 044	320	0	0	100	0	0	1000	0	0	1000	0	0
Sofia 046	100	0	0	320	0	0	320	0	0	1000	0	0
Sofia 048	320	0	0	100	0	0	1000	0	0	1000	0	0
Sofia 049	100	0	0	32	0	0	100	0	0	32	0	0
Sofia 091	320	0	0	100	0	0	320	0	0	320	0	0
Sydney 014	1000	0	0	1000	0	0	3200	0	0	3200	0	0
Posen 015	320	0	0	100	0	0	1000	0	0	100	0	0
Posen 018	100	0	0	0	0	0	320	0	0	32	0	0
Posen 033	100	0	0	10	0	0	100	0	0	32	0	0
Posen 045	32	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
Posen 053	100	0	0	10	0	0	1000	0	0	32	0	0
Posen 060	1000	0	0	1000	0	0	3200	0	0	3200	0	0

	IgG						IgG/IgG ₄					
Posen 069	320	0	0	320	0	0	1000	0	0	1000	0	0
Posen 087	1000	0	0	1000	0	0	3200	0	0	1000	0	0
Warschau 006	320	0	0	100	0	0	\	\	\	\	\	\
Warschau 015	320	0	0	1000	0	0	1000	0	0	1000	0	0
Warschau 017	100	0	0	100	0	0	320	0	0	320	0	0
Warschau 020	10	0	0	32	0	0	10	0	0	32	0	0
Warschau 022	320	0	0	320	0	0	1000	0	0	320	0	0
Warschau 024	100	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0
Warschau 025	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Warschau 029	1000	0	0	3200	0	0	3200	0	0	3200	0	0
Warschau 034	100	0	0	100	0	0	1000	0	0	100	0	0
Warschau 035	10	0	0	100	0	0	10	0	0	100	0	0
Warschau 039	320	0	0	320	0	0	\	\	\	\	\	\
Warschau 041	100	0	0	100	0	0	1000	0	0	320	0	0
Warschau 044	320	0	0	1000	0	0	1000	0	0	3200	0	0
Warschau 047	320	0	0	1000	0	0	1000	0	0	1000	0	0
Warschau 049	0	0	0	320	0	0	100	0	0	320	0	0
Warschau 050	100	0	0	10	0	0	\	\	\	\	\	\
Warschau 076	320	0	0	320	0	0	1000	0	0	320	0	0
Tel Aviv 081	1000	0	0	320	0	0	3200	0	0	1000	0	0
Tel Aviv 085	320	100	0	100	0	0	320	100	0	100	0	0
Lübeck 304	100	0	0	100	0	0	320	0	0	320	0	0
	IgG ₄						IgG ₄ → IgG					
Posen 069	1000	0	0	320	0	0	1000	0	0	1000	0	0
Posen 087	1000	0	0	320	0	0	3200	0	0	1000	0	0
Warschau 006	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\
Warschau 015	1000	0	0	320	0	0	1000	0	0	1000	0	0
Warschau 017	320	0	0	100	0	0	1000	0	0	100	0	0
Warschau 020	10	0	0	0	0	0	100	0	0	32	0	0
Warschau 022	1000	0	0	100	0	0	1000	0	0	1000	0	0
Warschau 024	0	0	0	0	0	0	100	0	0	10	0	0
Warschau 025	100	0	0	32	0	0	320	0	0	100	0	0
Warschau 029	1000	0	0	1000	0	0	3200	0	0	3200	0	0
Warschau 034	320	0	0	100	0	0	1000	0	0	320	0	0
Warschau 035	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0
Warschau 039	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\
Warschau 041	100	0	0	0	0	0	320	0	0	100	0	0
Warschau 044	320	0	0	320	0	0	1000	0	0	3200	0	0
Warschau 047	320	0	0	100	0	0	1000	0	0	1000	0	0
Warschau 049	320	0	0	320	0	0	320	0	0	1000	0	0
Warschau 050	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\
Warschau 076	320	0	0	100	0	0	1000	0	0	320	0	0
Tel Aviv 081	320	0	0	10	0	0	1000	0	0	100	0	0
Tel Aviv 085	320	0	0	100	0	0	1000	100	0	100	0	0
Lübeck 304	100	0	0	10	0	0	320	0	0	32	0	0

	IgG						IgG/IgG ₄					
Lübeck 316	1000	0	0	1000	0	0	3200	0	0	1000	0	0
Peking 007	100	0	0	100	0	0	320	0	0	320	0	0
Peking 010	10	0	0	10	0	0	100	0	0	10	0	0
Peking 015	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Peking 027	320	0	0	1000	0	0	1000	0	0	1000	0	0
Peking 033	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
	IgG ₄						IgG ₄ → IgG					
Lübeck 316	100	0	0	0	0	0	1000	0	0	320	0	0
Peking 007	32	0	0	32	0	0	100	0	0	100	0	0
Peking 010	32	0	0	0	0	0	100	0	0	10	0	0
Peking 015	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0
Peking 027	320	0	0	100	0	0	320	0	0	320	0	0
Peking 033	100	0	0	32	0	0	100	0	0	100	0	0
Diagnose Pemphigus vulgaris												
	IgG						IgG/IgG ₄					
Thessaloniki 001	1000	0	0	100	1000	0	1000	0	0	32	1000	0
Thessaloniki 002	10	0	0	0	32	0	\	\	\	\	\	\
Thessaloniki 005	1000	10	0	320	1000	0	1000	10	0	320	3200	0
Thessaloniki 015	320	0	0	100	320	0	1000	0	0	100	320	0
Thessaloniki 020	320	32	0	0	1000	0	1000	32	0	0	1000	0
Thessaloniki 021	320	0	0	0	1000	0	100	0	0	0	320	0
Thessaloniki 022	320	10	0	320	1000	0	320	0	0	320	1000	0
Thessaloniki 024	100	0	0	100	320	0	320	0	0	100	320	0
Thessaloniki 025	320	0	0	320	1000	0	320	0	0	320	1000	0
Thessaloniki 032	1000	0	0	320	1000	0	1000	0	0	320	1000	0
Thessaloniki 034	320	0	0	100	320	0	1000	0	0	320	1000	0
Thessaloniki 035	100	0	0	32	320	0	100	0	0	100	320	0
Thessaloniki 038	320	0	0	32	320	0	320	0	0	32	320	0
Thessaloniki 042	1000	0	0	320	1000	0	3200	0	0	320	1000	0
Thessaloniki 044	100	0	0	320	320	0	320	0	0	320	1000	0
	IgG ₄						IgG ₄ → IgG					
Thessaloniki 001	100	10	0	0	1000	0	1000	0	0	10	1000	0
Thessaloniki 002	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\
Thessaloniki 005	1000	32	0	320	1000	0	3200	32	0	320	3200	0
Thessaloniki 015	320	10	0	32	320	0	1000	0	0	100	320	0
Thessaloniki 020	0	0	0	0	0	0	3200	32	0	0	3200	0
Thessaloniki 021	320	0	0	0	100	0	320	0	0	0	320	0
Thessaloniki 022	100	0	0	100	320	0	1000	10	0	320	1000	0
Thessaloniki 024	320	0	0	100	320	0	320	10	0	100	1000	0
Thessaloniki 025	32	0	0	32	100	0	100	0	0	100	320	0
Thessaloniki 032	100	0	0	32	100	0	320	0	0	320	1000	0
Thessaloniki 034	32	0	0	10	100	0	320	10	0	100	1000	0
Thessaloniki 035	32	0	0	0	100	0	100	0	0	32	320	0
Thessaloniki 038	100	0	0	0	320	0	100	0	0	0	320	0
Thessaloniki 042	32	0	0	100	1000	0	32	0	0	100	1000	0
Thessaloniki 044	32	0	0	0	10	0	100	0	0	320	320	0

	IgG						IgG/IgG ₄					
Thessaloniki 055	32	0	0	0	320	0	32	0	0	0	320	0
Thessaloniki 060	100	0	100	100	32	0	100	0	0	100	100	0
Thessaloniki 072	10	0	0	10	100	0	32	0	0	10	100	0
Thessaloniki 075	100	32	0	320	320	0	100	32	0	320	320	0
Thessaloniki 076	32	0	0	320	320	0	32	0	0	320	320	0
Thessaloniki 077	10	0	0	32	100	0	32	0	0	32	100	0
Thessaloniki 078	100	0	0	32	320	0	320	0	0	32	320	0
Rom 001	100	0	0	10	320	0	100	0	0	10	320	0
Rom 002	100	0	0	320	320	0	100	0	0	320	1000	0
Rom 003	100	0	0	100	320	0	100	0	0	100	320	0
Rom 004	320	0	0	0	320	0	320	0	0	0	320	0
Rom 005	100	0	0	10	100	0	100	0	0	10	100	0
Rom 006	320	0	0	100	320	0	320	0	0	100	320	0
Rom 009	320	0	0	100	1000	0	320	0	0	100	1000	0
Rom 011	0	0	0	0	100	0	10	0	0	0	100	0
Rom 013	0	0	0	32	0	0	32	0	0	32	100	0
Rom 014	100	0	0	320	1000	0	320	0	0	320	1000	0
Rom 015	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Rom 016	320	0	0	32	320	0	320	0	0	32	1000	0
Rom 017	100	0	0	32	320	0	320	0	0	32	320	0
Rom 020	0	0	0	0	100	0	32	0	0	0	100	0
Rom 021	100	0	0	100	320	0	320	0	0	100	1000	0
	IgG ₄						IgG ₄ → IgG					
Thessaloniki 055	32	0	0	0	0	0	320	0	0	0	100	32
Thessaloniki 060	32	0	0	32	0	0	100	0	0	100	10	0
Thessaloniki 072	32	0	0	0	32	0	100	0	0	10	100	0
Thessaloniki 075	100	0	0	100	100	0	100	32	32	320	100	0
Thessaloniki 076	100	0	0	10	32	0	100	0	0	100	100	0
Thessaloniki 077	32	0	0	0	10	0	32	0	0	0	32	10
Thessaloniki 078	100	0	0	0	100	0	320	0	0	10	320	0
Rom 001	100	0	0	0	320	0	100	0	0	0	320	0
Rom 002	320	0	0	100	320	0	320	0	0	320	1000	0
Rom 003	32	0	0	32	100	0	100	0	0	100	100	0
Rom 004	100	0	0	0	100	0	320	0	0	0	320	0
Rom 005	100	0	0	0	100	0	100	0	0	10	100	0
Rom 006	100	0	0	32	100	0	320	0	0	100	320	0
Rom 009	320	0	0	10	320	0	1000	0	0	100	1000	0
Rom 011	10	0	0	0	10	0	32	0	0	0	100	0
Rom 013	32	0	0	0	0	0	32	0	0	10	0	0
Rom 014	320	0	100	100	320	0	1000	0	0	320	1000	0
Rom 015	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100	100	0
Rom 016	1000	0	0	10	1000	0	1000	0	0	10	1000	0
Rom 017	100	0	0	0	320	0	320	0	0	0	320	0
Rom 020	10	0	0	0	0	0	32	0	0	0	32	0
Rom 021	100	0	0	10	320	0	1000	0	0	100	1000	0

	IgG						IgG/IgG ₄					
Rom 022	32	0	0	10	320	0	100	0	0	10	320	0
Rom 024	320	0	0	10	1000	0	320	0	0	10	1000	0
Rom 025	100	0	0	100	320	0	100	0	0	100	320	0
Rom 026	100	0	0	0	320	0	320	0	0	0	320	0
Rom 027	1000	0	0	320	1000	0	1000	0	0	320	1000	0
Rom 029	100	0	0	100	32	0	100	0	0	100	32	0
Rom 033	100	0	0	0	320	0	100	0	0	0	320	0
Rom 038	320	0	0	100	320	0	320	0	0	100	1000	0
Rom 039	320	0	0	0	1000	0	320	0	0	0	1000	0
Rom 041	320	32	0	100	1000	0	1000	32	0	100	1000	0
Rom 047	320	0	0	320	320	0	320	0	0	320	1000	0
Rom 050	100	0	0	100	320	0	100	0	0	100	320	0
Rom 052	10	0	0	10	32	0	10	0	0	10	100	0
Rom 054	320	0	0	320	1000	0	1000	0	0	320	1000	0
Rom 059	320	10	0	100	1000	0	320	0	0	100	1000	0
Antalya 001	320	0	0	100	1000	0	320	0	0	100	1000	0
Antalya 004	100	0	0	10	320	0	100	0	0	10	320	0
Antalya 007	320	0	0	100	1000	0	320	0	0	100	1000	0
Antalya 008	100	0	0	10	1000	0	1000	0	0	10	3200	0
Antalya 009	100	0	0	0	320	0	100	0	0	0	320	0
Antalya 011	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0
Antalya 013	320	0	0	0	320	0	320	0	0	10	1000	0
	IgG ₄						IgG ₄ → IgG					
Rom 022	32	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0
Rom 024	1000	0	0	0	320	0	1000	0	0	0	1000	0
Rom 025	100	0	0	10	100	0	100	0	0	32	100	0
Rom 026	320	0	0	0	32	0	320	0	0	0	320	0
Rom 027	1000	0	0	0	3200	0	1000	0	0	100	1000	0
Rom 029	320	0	0	32	32	0	100	0	100	100	32	0
Rom 033	32	0	0	0	32	0	100	0	0	0	320	0
Rom 038	320	0	0	10	320	0	320	0	100	10	320	0
Rom 039	320	0	0	0	320	0	320	0	0	0	1000	0
Rom 041	1000	0	0	100	320	0	1000	0	0	100	1000	0
Rom 047	320	0	0	320	320	0	320	0	0	320	320	0
Rom 050	32	0	0	10	32	0	100	0	320	100	320	0
Rom 052	10	0	0	0	10	0	10	0	0	10	32	0
Rom 054	320	0	0	100	1000	0	1000	0	0	320	1000	0
Rom 059	320	0	0	0	100	0	1000	0	0	100	1000	0
Antalya 001	100	0	0	0	100	0	320	0	0	32	320	0
Antalya 004	100	0	0	0	100	0	100	0	0	10	320	0
Antalya 007	320	0	0	100	320	0	320	0	0	100	1000	0
Antalya 008	1000	0	0	0	1000	0	1000	0	0	0	1000	0
Antalya 009	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	320	0
Antalya 011	32	0	0	0	10	0	100	0	0	0	100	0
Antalya 013	320	0	0	0	320	0	320	0	0	0	320	0

	IgG						IgG/IgG ₄					
Antalya 023	320	0	0	320	1000	0	1000	0	0	320	1000	0
Antalya 026	320	0	0	100	1000	0	320	0	0	100	1000	0
Antalya 030	320	32	0	1000	100	0	320	10	0	1000	100	0
Antalya 031	10	0	0	10	100	0	32	10	0	10	100	0
Antalya 034	100	0	0	320	320	0	320	0	0	320	320	0
Antalya 037	320	0	0	320	1000	0	320	0	0	320	1000	0
Belgrad 002	320	0	0	100	320	0	320	0	0	320	320	0
Belgrad 003	32	10	0	10	100	0	100	32	0	10	100	0
Belgrad 008	320	32	0	100	1000	0	1000	32	0	100	1000	0
Belgrad 009	320	0	0	320	1000	0	1000	0	0	320	1000	0
Belgrad 011	320	0	0	320	1000	0	1000	0	0	320	3200	0
Belgrad 012	100	0	0	0	1000	0	100	0	0	0	1000	0
Belgrad 013	320	0	0	320	1000	0	1000	0	0	320	1000	0
Belgrad 014	100	0	0	100	1000	0	320	0	0	100	1000	0
Belgrad 015	320	0	0	320	10	0	1000	0	0	320	10	0
Belgrad 016	320	0	0	320	1000	0	1000	0	0	320	1000	0
Belgrad 019	320	0	0	100	1000	0	1000	0	0	100	1000	0
Belgrad 021	100	0	0	32	320	0	320	0	0	100	1000	0
Belgrad 022	320	0	0	320	320	0	320	0	0	320	320	0
Belgrad 026	0	10	0	100	320	0	0	10	0	100	320	0
Belgrad 028	100	0	0	0	1000	0	100	0	0	10	1000	0
Belgrad 030	100	0	0	320	1000	0	320	0	0	320	1000	0
	IgG ₄						IgG ₄ → IgG					
Antalya 023	1000	0	0	100	320	0	320	0	0	320	1000	0
Antalya 026	100	0	0	0	100	0	100	0	0	32	100	0
Antalya 030	100	0	0	100	0	0	100	0	0	320	100	0
Antalya 031	32	0	0	0	32	0	32	0	0	0	32	0
Antalya 034	100	0	0	100	100	0	320	0	0	320	320	0
Antalya 037	100	0	0	32	100	0	320	0	0	320	320	0
Belgrad 002	100	0	0	32	100	0	320	0	0	100	320	0
Belgrad 003	10	0	0	0	32	0	100	0	0	0	100	0
Belgrad 008	320	0	0	100	320	0	1000	32	0	100	1000	0
Belgrad 009	1000	0	0	100	1000	0	3200	0	0	320	1000	0
Belgrad 011	1000	0	0	100	1000	0	1000	0	0	320	3200	0
Belgrad 012	0	0	0	0	0	0	320	0	0	0	1000	0
Belgrad 013	320	0	0	100	100	0	1000	0	0	320	1000	0
Belgrad 014	100	0	0	32	100	0	320	0	0	100	1000	0
Belgrad 015	100	0	0	0	0	0	1000	0	0	100	10	0
Belgrad 016	1000	0	0	100	1000	0	3200	0	0	320	3200	0
Belgrad 019	1000	0	0	100	1000	0	1000	0	0	100	1000	0
Belgrad 021	100	0	0	0	10	0	320	0	0	32	320	0
Belgrad 022	320	0	0	100	100	0	320	0	0	320	320	0
Belgrad 026	0	0	0	0	0	0	32	0	0	32	100	0
Belgrad 028	320	0	0	0	320	0	1000	0	0	0	3200	0
Belgrad 030	320	0	0	100	1000	0	1000	0	0	320	1000	0

	IgG						IgG/IgG ₄					
Belgrad 031	320	0	0	10	320	0	320	0	0	10	320	0
Belgrad 032	100	0	0	0	320	0	320	0	0	0	320	0
Belgrad 035	100	0	0	32	320	0	100	0	0	32	320	0
Belgrad 038	320	0	0	320	1000	0	1000	0	0	320	1000	0
Belgrad 046	320	0	0	320	1000	0	1000	0	0	320	1000	0
Belgrad 051	320	0	0	320	1000	0	320	0	0	320	1000	0
Belgrad 052	320	0	0	320	1000	0	1000	0	0	320	1000	0
Belgrad 054	100	0	0	32	1000	0	100	0	0	100	1000	0
Belgrad 057	1000	0	0	100	3200	0	3200	0	0	100	3200	0
Belgrad 058	320	0	0	320	1000	0	3200	0	0	320	3200	0
Belgrad 059	1000	0	100	100	3200	0	1000	0	100	100	3200	0
Belgrad 065	1000	0	100	100	3200	0	1000	0	100	100	3200	0
Belgrad 073	1000	0	0	100	1000	0	1000	0	0	100	1000	0
Belgrad 074	100	0	0	100	32	0	100	0	0	100	32	0
Belgrad 077	320	0	0	320	3200	0	1000	0	0	320	3200	0
Belgrad 084	320	10	0	100	1000	0	1000	10	0	100	3200	0
Bern 006	100	0	0	320	320	0	320	0	0	320	320	0
Bern 026	100	0	0	1000	100	0	320	0	0	1000	100	0
Bern 034	1000	0	0	10	1000	0	1000	0	0	10	1000	0
Bern 038	320	0	0	32	3200	0	1000	0	0	32	3200	0
Sofia 001	100	0	0	100	1000	0	320	0	0	100	1000	0
Sofia 002	320	0	0	320	1000	0	1000	0	0	320	1000	0
	IgG ₄						IgG ₄ → IgG					
Belgrad 031	320	0	0	0	320	0	320	0	0	0	320	0
Belgrad 032	320	0	0	0	32	0	1000	0	0	0	320	0
Belgrad 035	0	0	0	0	0	0	100	0	0	32	320	0
Belgrad 038	1000	0	0	100	1000	0	1000	0	0	320	1000	0
Belgrad 046	320	0	0	100	320	0	1000	0	0	320	1000	0
Belgrad 051	100	0	0	10	100	0	320	0	0	100	1000	0
Belgrad 052	320	0	0	100	1000	0	320	0	0	100	1000	0
Belgrad 054	100	0	0	10	320	0	100	0	0	32	1000	0
Belgrad 057	1000	0	0	32	1000	0	1000	0	0	100	3200	0
Belgrad 058	320	0	0	100	320	0	3200	0	0	100	1000	0
Belgrad 059	320	0	0	10	0	0	320	0	320	100	1000	0
Belgrad 065	320	0	0	10	320	0	1000	0	0	100	3200	0
Belgrad 073	1000	0	0	32	1000	0	1000	0	0	10	1000	0
Belgrad 074	10	0	0	10	0	0	100	0	0	100	32	0
Belgrad 077	1000	0	0	100	1000	0	3200	0	0	320	3200	0
Belgrad 084	1000	0	0	10	1000	0	1000	0	0	100	1000	0
Bern 006	320	0	0	100	100	0	320	0	0	320	100	0
Bern 026	320	0	0	100	0	0	1000	0	0	1000	100	0
Bern 034	100	0	0	0	100	0	1000	0	0	0	3200	0
Bern 038	1000	0	0	0	1000	0	1000	0	0	10	3200	0
Sofia 001	100	0	0	10	320	0	320	0	0	100	1000	0
Sofia 002	100	0	0	100	100	0	1000	0	0	320	1000	0

	IgG						IgG/IgG ₄					
Sofia 003	320	0	0	10	1000	0	320	0	0	10	1000	0
Sofia 004	320	0	0	100	1000	0	1000	0	0	32	1000	0
Sofia 005	1000	0	0	320	3200	0	3200	0	0	320	3200	0
Sofia 006	1000	0	0	320	320	0	1000	0	0	320	1000	0
Sofia 007	320	0	0	0	320	0	1000	0	0	0	1000	0
Sofia 008	1000	0	0	1000	100	0	1000	0	0	1000	100	0
Sofia 010	100	32	0	0	320	0	100	10	0	0	320	320
Sofia 011	1000	0	0	320	1000	0	3200	0	0	320	3200	0
Sofia 012	100	0	0	100	3200	0	1000	0	0	100	3200	0
Sofia 013	1000	0	0	320	3200	0	3200	0	0	1000	3200	0
Sofia 014	100	0	0	0	320	0	100	0	0	0	320	0
Sofia 015	320	0	10	0	1000	32	320	0	100	0	1000	100
Sofia 016	1000	0	0	100	3200	0	3200	0	0	100	3200	0
Sofia 017	1000	0	0	1000	3200	0	3200	0	0	1000	3200	0
Sofia 018	3200	0	0	3200	320	0	3200	0	0	3200	1000	0
Sofia 019	1000	0	0	1000	3200	10	1000	0	0	1000	3200	0
Sofia 020	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	10	0
Sofia 021	100	0	0	10	1000	0	320	0	0	10	3200	0
Sofia 024	320	0	0	0	320	0	320	0	0	0	320	0
Sofia 026	320	0	0	100	1000	0	1000	0	0	100	1000	0
Sofia 028	1000	0	0	10	3200	0	3200	0	0	10	3200	0
Sofia 029	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	32	0
	IgG ₄						IgG ₄ → IgG					
Sofia 003	32	0	0	0	100	0	320	0	100	0	1000	0
Sofia 004	100	0	0	0	100	0	1000	0	0	32	1000	0
Sofia 005	1000	0	0	100	1000	0	3200	0	0	320	3200	0
Sofia 006	1000	0	0	100	100	0	3200	0	0	320	320	0
Sofia 007	100	0	0	0	100	0	1000	0	0	0	320	0
Sofia 008	1000	0	0	100	0	0	1000	0	0	1000	32	0
Sofia 010	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0
Sofia 011	3200	0	0	100	1000	0	3200	0	0	1000	3200	0
Sofia 012	1000	0	0	10	1000	0	1000	0	0	32	3200	0
Sofia 013	3200	0	0	320	3200	0	3200	0	0	1000	3200	0
Sofia 014	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	320	0
Sofia 015	320	0	0	0	320	0	320	0	0	0	1000	0
Sofia 016	3200	0	0	10	3200	0	3200	0	0	100	3200	0
Sofia 017	1000	0	0	320	1000	0	3200	0	0	1000	3200	0
Sofia 018	3200	0	0	1000	320	0	3200	0	0	3200	1000	0
Sofia 019	1000	0	0	32	320	0	1000	0	0	1000	3200	0
Sofia 020	0	0	0	0	0	0	32	0	0	0	0	0
Sofia 021	320	0	0	0	320	0	320	0	0	0	1000	0
Sofia 024	32	0	0	0	0	0	320	0	0	0	32	0
Sofia 026	1000	0	0	10	100	0	1000	0	0	100	1000	0
Sofia 028	1000	0	0	0	1000	0	3200	0	0	10	3200	0
Sofia 029	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100	0

	IgG						IgG/IgG ₄					
Sofia 030	3200	0	0	1000	1000	0	3200	0	0	1000	3200	0
Sofia 031	3200	0	0	0	3200	0	3200	0	0	0	3200	0
Sofia 032	3200	0	0	100	3200	0	\	\	\	\	\	\
Sofia 033	100	0	0	0	320	0	100	0	0	0	1000	0
Sofia 034	3200	0	0	32	3200	0	3200	0	0	10	3200	0
Sofia 035	320	0	0	100	1000	0	1000	0	0	100	3200	0
Sofia 038	1000	0	0	100	1000	0	1000	0	0	100	1000	0
Sofia 039	1000	0	0	10	3200	0	3200	0	0	32	3200	0
Sofia 040	1000	0	0	100	3200	0	3200	0	0	100	3200	0
Sofia 041	100	0	0	0	100	0	\	\	\	\	\	\
Sofia 045	1000	0	0	320	1000	0	3200	0	0	320	3200	0
Sofia 047	1000	0	0	0	320	0	1000	10	0	0	100	0
Sofia 050	100	0	0	100	320	0	100	0	0	100	320	0
Sofia 051	1000	0	0	0	3200	0	3200	10	10	0	3200	0
Sofia 052	320	0	0	320	10	0	1000	0	0	320	10	0
Sofia 053	320	0	0	1000	1000	0	1000	0	0	1000	3200	0
Sofia 054	320	0	0	32	3200	0	320	0	0	32	3200	0
Sofia 055	1000	0	0	1000	3200	0	1000	0	0	1000	3200	0
Sofia 056	320	0	0	100	3200	0	1000	0	0	100	3200	0
Sofia 057	1000	0	0	1000	3200	0	3200	0	0	1000	3200	0
Sofia 058	320	0	0	100	3200	0	1000	0	0	100	3200	0
Sofia 059	1000	0	0	1000	1000	0	1000	0	0	1000	3200	0
	IgG ₄						IgG ₄ → IgG					
Sofia 030	1000	0	0	100	1000	0	3200	0	0	1000	3200	0
Sofia 031	1000	0	0	0	320	0	3200	0	0	0	3200	0
Sofia 032	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\
Sofia 033	32	0	0	0	100	0	100	0	0	0	320	0
Sofia 034	100	0	0	0	320	0	3200	0	0	10	3200	0
Sofia 035	32	0	0	10	100	0	1000	0	0	100	1000	0
Sofia 038	100	0	0	0	320	0	3200	0	0	10	1000	0
Sofia 039	1000	0	0	0	1000	0	3200	0	0	10	3200	0
Sofia 040	1000	0	0	10	1000	0	3200	0	0	100	3200	0
Sofia 041	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\
Sofia 045	1000	0	0	10	1000	0	3200	0	0	320	3200	0
Sofia 047	32	0	0	0	0	0	320	10	0	0	32	0
Sofia 050	100	0	0	32	100	0	320	0	0	100	320	0
Sofia 051	1000	0	0	0	1000	0	1000	10	0	0	3200	0
Sofia 052	320	0	0	100	0	0	1000	0	0	320	10	0
Sofia 053	1000	0	0	1000	320	0	3200	0	0	1000	3200	0
Sofia 054	100	0	0	0	10	0	1000	0	0	10	1000	0
Sofia 055	10	0	0	0	0	0	1000	0	0	100	3200	0
Sofia 056	1000	0	0	10	320	0	1000	0	0	100	1000	0
Sofia 057	1000	0	0	0	1000	0	3200	0	0	320	3200	0
Sofia 058	3200	0	0	32	3200	0	3200	0	0	100	3200	0
Sofia 059	1000	0	0	100	320	0	1000	0	0	1000	3200	0

	IgG						IgG/IgG ₄					
Sofia 060	1000	0	0	1000	1000	0	3200	0	0	3200	3200	0
Sofia 062	320	0	0	1000	3200	0	1000	0	0	1000	3200	0
Sofia 063	1000	0	0	3200	3200	0	3200	0	0	3200	3200	0
Sofia 064	320	0	0	1000	1000	0	1000	0	0	1000	1000	0
Sofia 065	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0
Sofia 066	320	0	0	0	1000	0	1000	0	0	0	3200	0
Sofia 067	320	0	0	1000	3200	0	1000	0	0	1000	3200	0
Sofia 068	320	0	0	1000	3200	0	1000	0	0	1000	3200	0
Sofia 069	320	0	0	32	100	0	100	0	0	32	100	0
Sofia 070	100	0	0	32	1000	0	100	0	0	32	3200	0
Sofia 072	100	0	0	32	100	0	100	0	0	32	320	0
Sofia 073	320	0	0	1000	1000	0	1000	0	0	3200	3200	0
Sofia 074	320	0	0	100	1000	0	3200	0	0	100	3200	0
Sofia 075	100	0	0	0	10	32	100	0	0	0	10	32
Sofia 076	320	0	0	1000	1000	0	1000	0	0	1000	1000	0
Sofia 077	320	0	0	10	3200	0	1000	0	0	10	3200	0
Sofia 078	1000	0	0	1000	3200	0	1000	0	0	1000	3200	0
Sofia 079	100	0	0	10	1000	0	100	0	0	10	1000	0
Sofia 080	1000	0	0	1000	3200	0	3200	0	0	3200	3200	0
Sofia 082	100	0	0	100	320	0	100	0	0	100	1000	0
Sofia 084	1000	0	0	100	1000	0	1000	0	0	100	1000	0
Sofia 085	100	0	0	0	100	0	320	0	0	0	320	0
	IgG ₄						IgG ₄ → IgG					
Sofia 060	3200	0	0	100	1000	0	1000	0	0	1000	3200	0
Sofia 062	3200	0	0	100	3200	0	3200	0	0	320	3200	0
Sofia 063	3200	0	0	320	3200	0	3200	0	0	1000	3200	0
Sofia 064	1000	0	0	100	320	0	1000	0	0	1000	1000	0
Sofia 065	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100	0
Sofia 066	3200	0	0	0	3200	0	1000	0	0	0	3200	0
Sofia 067	1000	0	0	100	320	0	1000	0	0	1000	3200	0
Sofia 068	1000	0	0	100	1000	0	1000	0	0	320	3200	0
Sofia 069	32	0	0	10	10	0	100	0	0	100	100	0
Sofia 070	100	0	0	0	100	0	320	0	0	10	320	0
Sofia 072	1000	0	0	10	320	0	320	32	0	10	320	0
Sofia 073	1000	0	0	320	320	0	1000	0	0	1000	1000	0
Sofia 074	1000	0	0	32	1000	0	3200	0	0	100	3200	0
Sofia 075	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	10	0
Sofia 076	100	0	0	100	100	0	1000	0	0	1000	1000	0
Sofia 077	320	0	0	0	10	0	1000	0	0	10	1000	0
Sofia 078	1000	0	0	100	1000	0	3200	0	0	1000	3200	0
Sofia 079	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100	0
Sofia 080	1000	0	0	100	1000	0	3200	0	0	1000	3200	0
Sofia 082	100	0	0	10	32	0	100	0	0	100	320	0
Sofia 084	320	0	0	32	100	0	1000	0	0	32	1000	0
Sofia 085	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0

	IgG						IgG/IgG ₄					
Sofia 086	100	0	0	100	32	0	100	0	0	100	32	0
Sofia 087	0	0	0	10	10	0	0	0	0	10	10	0
Sofia 088	1000	0	0	320	3200	0	3200	0	0	1000	3200	0
Sofia 089	320	0	0	3200	32	0	320	0	0	3200	100	0
Sofia 090	100	0	0	0	320	0	100	0	0	0	1000	0
Sofia 092	320	0	0	100	3200	0	1000	0	0	100	3200	0
Sofia 093	320	0	0	100	3200	0	3200	0	0	100	3200	0
Sofia 094	320	0	0	100	3200	0	1000	0	0	100	3200	0
Sofia 095	0	0	0	10	10	0	10	0	0	10	10	0
Sofia 097	1000	0	0	320	3200	0	\	\	\	\	\	\
Sofia 098	100	0	0	320	1000	0	1000	0	0	320	1000	0
Sofia 118	100	0	0	0	10	0	100	0	0	0	10	0
Sydney 001	100	0	0	0	1000	0	100	0	0	10	1000	0
Sydney 010	100	0	0	0	320	0	100	0	0	0	1000	0
Sydney 012	100	0	0	100	320	0	320	0	0	100	1000	0
Sydney 017	100	0	0	0	100	0	10	0	0	0	100	0
Sydney 019	100	0	0	0	320	0	320	0	0	0	1000	0
Sydney 023	100	0	0	10	320	0	100	0	0	10	1000	0
Posen 003	1000	0	0	100	1000	0	1000	0	0	100	1000	0
Posen 005	1000	0	0	0	3200	0	1000	0	0	0	3200	0
Posen 013	1000	0	0	100	3200	0	3200	0	0	100	3200	0
Posen 022	100	0	0	100	1000	0	100	0	0	100	1000	0
	IgG ₄						IgG ₄ → IgG					
Sofia 086	32	0	0	32	10	0	100	0	0	100	32	0
Sofia 087	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sofia 088	100	0	0	100	100	0	1000	0	0	320	3200	0
Sofia 089	320	0	0	100	0	0	1000	0	0	1000	10	0
Sofia 090	100	0	0	0	100	0	320	0	0	0	1000	0
Sofia 092	3200	0	0	10	3200	0	3200	0	0	100	3200	0
Sofia 093	1000	0	0	10	3200	0	3200	0	0	32	3200	0
Sofia 094	1000	0	0	10	1000	0	1000	0	0	100	3200	0
Sofia 095	100	0	0	0	0	0	100	0	0	10	0	0
Sofia 097	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\
Sofia 098	320	0	0	100	100	0	320	0	0	320	1000	0
Sofia 118	0	0	0	0	0	0	320	0	0	0	0	0
Sydney 001	100	0	0	0	100	0	320	0	0	0	1000	0
Sydney 010	100	0	0	0	32	0	100	0	0	0	100	0
Sydney 012	320	0	0	32	100	0	320	0	0	100	320	0
Sydney 017	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	32	0
Sydney 019	32	0	0	0	100	0	320	0	0	0	320	0
Sydney 023	32	0	0	0	32	0	100	0	0	0	320	0
Posen 003	100	0	0	0	100	0	1000	0	0	100	1000	0
Posen 005	100	0	0	0	100	0	1000	0	0	0	3200	0
Posen 013	1000	0	0	0	1000	0	3200	0	0	32	3200	0
Posen 022	320	0	0	32	320	0	320	0	0	100	1000	0

	IgG						IgG/IgG ₄					
Posen 023	32	0	0	1000	10	0	100	0	0	1000	10	0
Posen 032	100	0	0	100	1000	0	1000	0	0	100	3200	0
Posen 034	100	0	0	1000	1000	0	1000	0	0	1000	1000	0
Posen 048	320	0	0	320	1000	0	3200	0	0	1000	3200	0
Posen 059	320	0	0	100	3200	0	1000	0	0	100	3200	0
Posen 068	320	0	0	0	1000	0	1000	0	0	0	1000	0
Posen 071	10	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0
Posen 086	100	0	0	0	320	0	100	0	0	0	320	0
Warschau 001	1000	0	0	1000	1000	0	1000	0	0	1000	1000	0
Warschau 021	1000	0	0	320	1000	0	1000	0	0	320	1000	0
Warschau 023	100	0	0	32	100	0	320	0	0	32	100	0
Warschau 026	100	0	0	0	3200	0	1000	0	0	0	3200	0
Warschau 031	320	0	0	100	320	0	320	0	0	100	320	0
Warschau 032	1000	0	0	100	1000	0	3200	0	0	100	3200	0
Warschau 038	320	0	0	0	3200	0	1000	0	0	0	3200	0
Warschau 040	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0
Warschau 043	1000	0	0	100	3200	0	3200	0	0	100	3200	0
Warschau 046	100	0	0	1000	1000	0	100	0	0	1000	1000	0
Warschau 048	320	0	0	0	1000	0	320	100	0	0	1000	0
Warschau 051	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0
Warschau 054	1000	0	0	0	3200	0	3200	0	0	0	3200	0
Warschau 057	1000	0	0	0	1000	0	1000	0	0	0	1000	0
	IgG ₄						IgG ₄ → IgG					
Posen 023	320	0	0	100	0	0	320	0	0	100	0	0
Posen 032	1000	0	0	10	3200	0	1000	0	0	100	3200	0
Posen 034	100	0	0	32	100	0	320	32	0	100	320	0
Posen 048	320	0	0	100	1000	0	3200	0	0	320	3200	0
Posen 059	320	0	0	0	320	0	3200	0	0	100	3200	0
Posen 068	320	0	0	0	1000	0	320	0	0	0	1000	0
Posen 071	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	10	0
Posen 086	32	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100	0
Warschau 001	100	0	0	100	100	0	320	0	0	1000	1000	0
Warschau 021	320	0	0	0	100	0	1000	0	0	32	320	0
Warschau 023	100	0	0	10	10	0	320	0	0	10	32	0
Warschau 026	100	0	0	0	320	0	1000	0	0	0	3200	0
Warschau 031	32	0	0	10	32	0	320	0	0	100	320	0
Warschau 032	0	0	0	0	0	0	3200	0	0	10	3200	0
Warschau 038	1000	0	0	0	1000	0	1000	0	0	0	3200	0
Warschau 040	32	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0
Warschau 043	3200	0	0	0	3200	0	3200	0	0	10	3200	0
Warschau 046	100	32		0	100	0	320	100	0	320	320	0
Warschau 048	320	0	0	0	100	0	1000	100	100	0	1000	0
Warschau 051	10	0	0	0	32	0	10	0	0	0	32	0
Warschau 054	1000	0	0	0	1000	0	3200	0	0	0	3200	0
Warschau 057	100	0	0	0	100	0	320	0	0	0	1000	0

	IgG						IgG/IgG ₄					
Warschau 066	1000	0	0	0	1000	0	320	0	0	0	3200	0
Warschau 067	1000	0	0	100	3200	0	1000	0	0	100	3200	0
Tel Aviv 012	1000	0	0	320	3200	0	3200	0	0	1000	3200	0
Tel Aviv 013	3200	0	0	1000	3200	0	3200	0	0	1000	3200	0
Tel Aviv 014	100	0	0	0	1000	0	100	0	0	0	1000	0
Tel Aviv 016	100	0	0	32	32	0	100	0	0	100	32	0
Tel Aviv 018	320	0	0	0	1000	0	1000	0	0	0	1000	0
Tel Aviv 019	1000	0	0	100	1000	0	3200	0	0	100	3200	0
Tel Aviv 020	320	0	0	0	1000	0	1000	0	0	0	1000	0
Tel Aviv 026	1000	0	0	32	3200	0	3200	0	0	100	3200	0
Tel Aviv 027	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0
Tel Aviv 031	320	0	0	10	1000	0	320	0	0	10	1000	0
Tel Aviv 032	320	0	0	10	3200	0	1000	0	0	10	3200	0
Tel Aviv 033	100	0	0	0	100	0	320	0	0	0	100	0
Tel Aviv 034	1000	0	0	10	3200	0	3200	0	0	10	3200	0
Tel Aviv 035	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0
Tel Aviv 036	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0
Tel Aviv 051	320	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0
Tel Aviv 052	1000	0	0	1000	1000	0	1000	0	0	1000	1000	0
Tel Aviv 054	1000	0	0	0	1000	0	3200	0	0	0	1000	0
Tel Aviv 055	1000	0	0	0	1000	0	1000	0	0	0	3200	0
Tel Aviv 058	1000	0	0	0	1000	0	1000	0	0	0	3200	0
	IgG ₄						IgG ₄ → IgG					
Warschau 066	3200	0	0	0	3200	0	3200	100	0	0	3200	0
Warschau 067	100	0	0	0	100	0	320	0	0	10	320	0
Tel Aviv 012	320	0	0	10	320	0	3200	0	0	100	1000	0
Tel Aviv 013	1000	0	0	100	1000	0	3200	0	0	1000	3200	0
Tel Aviv 014	10	0	0	0	0	0	320	0	0	0	1000	0
Tel Aviv 016	10	0	0	0	0	0	100	0	0	32	32	0
Tel Aviv 018	100	0	0	0	100	0	1000	0	0	0	1000	0
Tel Aviv 019	320	0	0	10	1000	0	3200	0	0	100	3200	0
Tel Aviv 020	320	0	0	0	100	0	1000	0	0	0	1000	0
Tel Aviv 026	1000	0	0	10	1000	0	1000	0	0	32	3200	0
Tel Aviv 027	32	0	0	0	0	0	100	0	0	0	32	0
Tel Aviv 031	100	0	0	0	10	0	320	0	0	0	320	0
Tel Aviv 032	320	0	0	0	320	0	3200	0	0	10	3200	0
Tel Aviv 033	100	0	0	0	0	0	320	0	0	0	32	0
Tel Aviv 034	3200	0	0	0	3200	0	3200	0	0	0	3200	0
Tel Aviv 035	32	0	0	0	10	0	100	0	0	0	100	0
Tel Aviv 036	100	0	0	0	32	0	100	0	0	0	100	0
Tel Aviv 051	100	0	0	0	0	0	320	0	0	0	100	0
Tel Aviv 052	100	0	0	100	100	0	100	0	0	1000	1000	0
Tel Aviv 054	320	0	0	0	100	0	1000	0	0	0	1000	0
Tel Aviv 055	320	0	0	0	100	0	3200	0	0	0	3200	0
Tel Aviv 058	100	0	0	0	0	0	1000	0	0	0	1000	0

	IgG						IgG/IgG ₄					
Tel Aviv 059	320	0	0	0	100	0	320	0	0	0	100	0
Tel Aviv 066	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0
Tel Aviv 068	320	0	0	1000	0	0	1000	0	0	1000	10	0
Tel Aviv 069	1000	0	0	0	1000	0	1000	0	0	0	3200	0
Tel Aviv 076	100	0	0	0	1000	0	100	0	0	0	3200	0
Tel Aviv 078	1000	0	0	100	3200	0	3200	0	0	100	3200	0
Lübeck 217	100	0	0	100	100	0	100	0	0	100	320	0
Lübeck 224	320	0	0	0	100	0	1000	0	0	0	320	0
Lübeck 228	100	0	0	0	1000	0	320	0	0	0	1000	0
Lübeck 317	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0
Peking 003	1000	0	0	320	1000	0	1000	0	0	320	1000	0
Peking 004	320	0	0	100	1000	0	1000	0	0	100	1000	0
Peking 005	1000	0	0	100	1000	0	3200	0	0	100	3200	0
Peking 006	100	0	0	10	100	0	320	0	0	100	1000	0
Peking 009	1000	0	0	100	1000	0	1000	0	0	100	1000	0
Peking 012	100	0	0	320	100	0	100	0	0	320	100	0
Peking 013	100	0	0	32	1000	0	320	0	0	100	1000	0
Peking 022	320	0	0	1000	1000	0	320	0	0	1000	1000	0
Peking 030	1000	0	0	1000	1000	0	1000	0	0	1000	1000	0
Peking 035	1000	0	0	1000	3200	0	1000	0	0	1000	3200	0
Brünn 002	1000	0	0	1000	1000	0	3200	0	0	3200	3200	0
Brünn 007	100	0	0	10	320	0	100	0	0	10	320	0
	IgG ₄						IgG ₄ → IgG					
Tel Aviv 059	32	0	0	0	10	0	100	0	0	0	100	0
Tel Aviv 066	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	10	0
Tel Aviv 068	100	0	0	32	0	0	100	0	0	320	0	0
Tel Aviv 069	1000	0	0	0	1000	0	3200	0	0	0	3200	0
Tel Aviv 076	100	0	0	0	320	0	320	0	0	0	1000	0
Tel Aviv 078	3200	0	0	10	3200	0	3200	0	0	100	3200	0
Lübeck 217	10	0	0	0	10	0	100	0	0	100	100	0
Lübeck 224	1000	0	0	0	320	0	1000	0	0	0	1000	0
Lübeck 228	100	0	0	0	100	0	320	0	0	0	1000	0
Lübeck 317	0	0	0	0	0	0	320	0	0	0	100	0
Peking 003	100	0	0	32	100	0	1000	0	0	320	1000	0
Peking 004	320	0	0	10	1000	0	1000	0	0	100	1000	0
Peking 005	1000	0	0	32	1000	0	1000	0	0	100	1000	0
Peking 006	0	0	0	0	0	0	1000	0	0	100	1000	0
Peking 009	1000	0	0	0	1000	0	1000	0	0	100	1000	0
Peking 012	100	0	0	10	10	0	100	0	0	100	100	0
Peking 013	100	0	0	0	100	0	1000	0	0	32	1000	0
Peking 022	1000	0	0	100	320	0	1000	0	0	1000	1000	0
Peking 030	100	0	0	100	100	0	1000	0	0	1000	1000	0
Peking 035	1000	0	0	100	1000	0	1000	0	0	1000	3200	0
Brünn 002	1000	0	0	320	1000	0	1000	0	0	1000	1000	0
Brünn 007	32	0	0	0	100	0	100	0	0	0	320	0

Diagnose paraneoplastischer Pemphigus												
	IgG						IgG/IgG ₄					
Sofia 081	10	1000	0	0	10	1000	0	1000	0	0	10	1000
Sofia 083	0	1000	0	10	1000	1000	0	1000	0	10	1000	1000
Peking 29	320	1000	0	100	100	0	1000	1000	0	100	100	0
Peking 34	1000	1000	0	10	1000	0	1000	1000	0	10	3200	0
	IgG ₄						IgG ₄ → IgG					
Sofia 081	0	100	0	0	0	0	320	1000	0	0	10	1000
Sofia 083	0	100	0	0	0	0	320	320	0	10	320	1000
Peking 29	0	0	0	0	0	0	1000	1000	0	100	100	0
Peking 34	1000	100	0	0	100	0	1000	1000	0	0	1000	0
Diagnose IgA-Pemphigus												
	IgA											
Sofia 055	1000	0	0	0	3200	0						
Lübeck 319	1000	0	0	0	0	0						

Ösophagus BM
Spalthaut BD
Spalthaut BB
BP180
BP230
Ösophagus BM
Spalthaut BD
Spalthaut BB
BP180
BP230

Diagnose Bullöses Pemphigoid											
	IgG						IgG/IgG ₄				
Thessaloniki 004	100	320	0	320	0	0	320	1000	0	320	0
Thessaloniki 006	1000	1000	0	320	320	0	3200	3200	0	320	320
Thessaloniki 010	10	100	32	100	0	0	32	100	32	32	0
Thessaloniki 011	32	100	0	320	0	0	32	100	0	320	0
Thessaloniki 013	320	320	0	320	320	0	1000	1000	0	1000	320
Thessaloniki 016	0	0	0	10	0	0	32	100	0	10	0
Thessaloniki 023	0	32	0	1000	0	0	0	320	0	1000	0
Thessaloniki 026	0	100	0	100	0	0	10	100	0	100	0
Thessaloniki 028	0	32	0	100	0	0	0	32	0	100	0
Thessaloniki 030	10	32	0	320	0	0	10	32	0	320	0
	IgG ₄						IgG ₄ → IgG				
Thessaloniki 004	320	100	0	0	0	0	100	320	0	100	0
Thessaloniki 006	3200	1000	0	0	320	0	3200	1000	0	100	320
Thessaloniki 010	100	10	0	0	0	0	32	10	0	100	0
Thessaloniki 011	32	10	0	0	0	0	32	100	0	320	0
Thessaloniki 013	1000	320	0	0	100	0	3200	1000	0	1000	1000
Thessaloniki 016	32	32	0	0	0	0	0	32	0	10	0
Thessaloniki 023	100	100	0	32	0	0	32	100	0	1000	0
Thessaloniki 026	10	10	0	0	0	0	10	100	0	32	0
Thessaloniki 028	10	10	0	32	0	0	0	32	0	100	0
Thessaloniki 030	10	10	0	32	0	0	10	32	0	320	0

	IgG					IgG/IgG ₄				
Thessaloniki 031	320	1000	0	1000	0	1000	1000	0	1000	0
Thessaloniki 036	100	320	0	10	0	320	1000	0	10	0
Thessaloniki 037	10	100	0	100	0	10	100	0	100	0
Thessaloniki 039	0	0	0	100	0	10	0	0	100	0
Thessaloniki 040	100	320	0	320	0	100	320	0	320	0
Thessaloniki 041	100	320	0	320	0	320	1000	0	320	0
Thessaloniki 043	320	1000	0	1000	320	3200	3200	0	1000	320
Thessaloniki 046	32	100	0	1000	0	100	320	0	1000	0
Thessaloniki 049	10	32	0	100	0	32	100	0	320	0
Thessaloniki 050	100	320	0	100	0	320	1000	0	100	0
Thessaloniki 051	1000	1000	0	320	100	3200	3200	0	100	100
Thessaloniki 053	0	100	0	320	0	0	100	0	320	0
Thessaloniki 054	32	32	0	320	0	10	32	0	320	0
Thessaloniki 056	100	320	0	100	0	100	320	0	100	0
Thessaloniki 058	320	1000	0	1000	0	320	1000	0	1000	0
Thessaloniki 059	320	1000	0	1000	0	320	1000	0	1000	0
Thessaloniki 061	100	320	0	10	0	100	320	0	10	0
Thessaloniki 063	0	32	0	100	0	0	10	0	100	0
Thessaloniki 068	100	100	0	320	0	320	1000	0	1000	0
Thessaloniki 069	0	32	0	100	0	0	100	0	100	0
Thessaloniki 073	32	320	0	320	0	100	1000	0	320	0
Thessaloniki 079	100	100	0	320	100	1000	1000	0	320	100
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Thessaloniki 031	320	320	0	100	0	100	320	0	1000	0
Thessaloniki 036	100	100	0	0	0	100	320	0	0	0
Thessaloniki 037	10	10	0	0	0	0	100	0	10	0
Thessaloniki 039	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
Thessaloniki 040	100	100	0	0	0	0	100	0	100	0
Thessaloniki 041	100	100	0	0	0	100	320	0	320	0
Thessaloniki 043	3200	1000	0	0	100	1000	1000	0	1000	1000
Thessaloniki 046	100	32	0	0	0	100	320	0	1000	0
Thessaloniki 049	32	100	0	0	0	10	32	0	320	0
Thessaloniki 050	320	320	0	0	0	320	320	0	10	0
Thessaloniki 051	3200	1000	0	0	100	1000	1000	0	100	320
Thessaloniki 053	32	100	0	10	0	10	100	0	100	0
Thessaloniki 054	10	10	0	0	0	10	32	0	320	0
Thessaloniki 056	320	320	0	0	0	320	320	0	10	0
Thessaloniki 058	100	320	0	0	0	320	1000	0	320	0
Thessaloniki 059	320	320	0	0	0	320	320	0	1000	0
Thessaloniki 061	100	100	0	0	0	32	32	0	0	0
Thessaloniki 063	0	0	0	0	0	0	10	0	100	0
Thessaloniki 068	320	320	0	320	0	1000	1000	0	1000	0
Thessaloniki 069	10	32	0	0	0	0	32	0	32	0
Thessaloniki 073	100	320	0	10	0	100	320	0	100	0
Thessaloniki 079	1000	320	0	10	100	1000	1000	0	100	100

	IgG					IgG/IgG ₄				
Rom 035	32	0	0	32	0	10	32	0	32	0
Rom 045	10	100	0	100	0	32	100	0	100	0
Rom 051	0	10	0	100	0	0	32	0	320	0
Rom 056	100	1000	0	320	0	320	1000	0	320	0
Antalya 012	10	100	0	320	0	32	100	0	320	0
Antalya 019	320	320	0	100	320	320	320	0	100	320
Antalya 022	0	10	0	100	0	0	10	0	32	0
Antalya 024	320	1000	0	320	1000	3200	3200	0	1000	1000
Antalya 039	320	1000	0	100	0	1000	1000	0	100	0
Antalya 049	10	320	0	10	0	100	320	0	10	0
Antalya 060	0	100	0	320	0	10	100	0	320	0
Antalya 073	100	100	0	100	0	100	100	0	100	0
Antalya 075	320	1000	0	320	1000	3200	3200	0	320	1000
Antalya 087	100	320	0	320	100	3200	3200	0	320	100
Belgrad 004	10	100	0	32	0	32	100	0	32	0
Belgrad 005	320	1000	0	1000	320	1000	1000	0	1000	320
Belgrad 006	320	1000	0	320	1000	1000	1000	0	320	1000
Belgrad 007	0	100	0	1000	0	10	100	0	1000	0
Belgrad 010	32	320	0	100	320	1000	1000	0	32	320
Belgrad 017	10	100	0	32	0	10	100	0	32	0
Belgrad 018	10	100	0	100	0	100	100	0	100	0
Belgrad 020	320	320	0	100	0	1000	1000	0	100	0
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Rom 035	32	100	0	0	0	32	100	0	10	0
Rom 045	0	0	0	0	0	32	100	0	100	0
Rom 051	0	32	0	32	0	0	32	0	100	0
Rom 056	100	320	0	0	0	100	1000	0	100	0
Antalya 012	100	100	0	0	10	100	100	0	320	0
Antalya 019	100	100	0	0	32	320	320	0	100	320
Antalya 022	0	10	0	0	0	0	10	0	32	0
Antalya 024	1000	1000	0	10	100	3200	3200	0	1000	320
Antalya 039	1000	1000	0	0	0	320	1000	0	100	0
Antalya 049	100	320	0	0	0	32	320	0	10	0
Antalya 060	10	32	0	32	0	10	100	0	100	0
Antalya 073	100	100	0	10	0	100	100	0	100	0
Antalya 075	3200	3200	0	0	1000	3200	3200	0	100	1000
Antalya 087	1000	1000	0	0	100	1000	1000	0	100	320
Belgrad 004	32	100	0	0	0	32	100	0	10	0
Belgrad 005	320	320	0	0	10	1000	1000	0	1000	320
Belgrad 006	1000	1000	0	0	320	1000	1000	0	100	1000
Belgrad 007	10	10	0	10	0	32	100	0	1000	0
Belgrad 010	3200	3200	0	0	320	3200	3200	0	32	320
Belgrad 017	0	100	0	0	0	10	100	0	10	0
Belgrad 018	320	320	0	0	0	100	320	0	100	0
Belgrad 020	1000	1000	0	0	100	1000	1000	0	100	0

	IgG					IgG/IgG ₄				
Belgrad 024	0	100	0	100	0	10	100	0	100	0
Belgrad 025	0	10	0	100	0	0	10	0	100	0
Belgrad 027	100	320	0	100	320	1000	1000	0	100	320
Belgrad 029	0	100	0	10	0	0	100	0	10	0
Belgrad 033	32	320	0	1000	10	100	1000	0	1000	10
Belgrad 041	100	320	0	320	0	320	1000	0	1000	0
Belgrad 042	100	100	0	320	10	1000	1000	0	320	100
Belgrad 043	320	320	0	100	320	1000	1000	0	100	320
Belgrad 045	100	320	0	1000	0	320	320	0	1000	0
Belgrad 047	0	100	0	100	0	0	100	0	100	0
Belgrad 048	0	32	0	10	0	0	32	0	10	0
Belgrad 049	10	32	0	320	0	100	100	0	320	0
Belgrad 050	10	100	0	32	0	10	100	0	32	0
Belgrad 053	0	100	0	10	0	10	100	0	10	0
Belgrad 055	0	32	0	100	0	10	32	0	320	0
Belgrad 062	0	100	10	100	0	100	100	100	100	0
Belgrad 063	0	32	0	100	0	0	32	0	100	0
Belgrad 064	100	1000	0	320	100	1000	1000	0	320	100
Belgrad 066	0	32	0	100	0	0	32	0	100	0
Belgrad 067	320	320	0	32	320	1000	1000	0	32	1000
Belgrad 069	10	320	0	100	0	10	320	0	100	0
Belgrad 070	100	320	0	320	0	100	320	0	320	0
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Belgrad 024	10	10	0	0	0	10	100	0	32	0
Belgrad 025	0	0	0	10	0	0	10	0	32	0
Belgrad 027	1000	1000	0	10	320	3200	3200	0	100	1000
Belgrad 029	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
Belgrad 033	320	1000	0	0	0	100	1000	0	1000	10
Belgrad 041	320	1000	0	320	0	320	1000	0	1000	0
Belgrad 042	1000	1000	0	0	320	1000	1000	0	32	100
Belgrad 043	320	1000	0	0	100	320	1000	0	100	320
Belgrad 045	100	100	0	32	0	100	100	0	1000	0
Belgrad 047	0	100	0	10	0	0	100	0	100	0
Belgrad 048	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
Belgrad 049	100	32	0	10	0	32	32	0	100	0
Belgrad 050	32	32	0	0	0	10	32	0	10	0
Belgrad 053	10	10	0	0	0	10	100	0	10	0
Belgrad 055	10	32	0	0	0	10	32	0	100	0
Belgrad 062	100	10	10	0	0	100	100	10	100	0
Belgrad 063	0	32	0	0	0	0	32	0	100	0
Belgrad 064	1000	1000	0	0	100	1000	1000	0	320	100
Belgrad 066	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
Belgrad 067	1000	1000	0	0	100	1000	1000	0	32	320
Belgrad 069	100	100	0	0	0	10	100	0	100	0
Belgrad 070	100	320	0	0	0	32	320	0	320	0

	IgG					IgG/IgG ₄				
Belgrad 071	100	320	0	1000	0	320	1000	0	1000	0
Belgrad 072	10	100	0	320	0	0	32	0	100	0
Belgrad 075	0	0	0	320	0	0	10	0	320	0
Belgrad 078	100	1000	0	320	0	0	1000	0	1000	0
Belgrad 079	100	320	0	320	0	320	1000	0	320	0
Belgrad 080	0	32	0	320	0	0	32	0	320	0
Belgrad 081	320	1000	0	320	320	1000	3200	0	320	1000
Belgrad 082	100	320	0	100	0	320	1000	0	100	0
Belgrad 083	100	320	0	10	0	320	1000	0	10	0
Belgrad 085	320	1000	0	1000	1000	3200	3200	0	1000	1000
Belgrad 086	320	1000	0	320	0	3200	3200	0	320	0
Bern 001	0	10	0	320	0	0	0	0	320	0
Bern 002	320	320	0	1000	1000	3200	3200	0	3200	1000
Bern 004	320	320	0	100	100	1000	1000	0	100	100
Bern 005	1000	1000	0	100	320	3200	3200	0	100	320
Bern 007	0	10	0	100	0	0	0	0	100	0
Bern 008	100	320	0	100	0	100	1000	0	100	0
Bern 009	0	320	0	1000	0	0	1000	0	320	0
Bern 010	100	320	0	10	0	1000	1000	0	10	0
Bern 012	10	100	0	32	0	32	100	0	32	0
Bern 016	0	100	0	0	10	0	10	0	0	10
Bern 017	10	10	0	32	0	32	32	0	32	0
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Belgrad 071	320	320	0	100	0	32	320	0	1000	0
Belgrad 072	0	0	0	0	0	10	0	0	10	0
Belgrad 075	0	0	0	10	0	0	32	0	320	0
Belgrad 078	100	320	0	100	0	100	320	0	1000	0
Belgrad 079	320	320	0	0	0	100	1000	0	320	0
Belgrad 080	0	0	0	0	0	0	32	0	320	0
Belgrad 081	1000	1000	0	0	100	1000	1000	0	100	1000
Belgrad 082	100	320	0	0	10	100	320	0	100	0
Belgrad 083	320	1000	0	0	10	100	1000	0	10	0
Belgrad 085	3200	3200	0	10	1000	3200	3200	0	320	1000
Belgrad 086	1000	1000	0	10	0	1000	1000	0	100	0
Bern 001	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
Bern 002	1000	1000	0	10	320	1000	1000	0	1000	1000
Bern 004	1000	1000	0	0	100	1000	1000	0	32	100
Bern 005	1000	1000	0	0	100	1000	1000	0	10	320
Bern 007	0	0	0	0	0	0	10	0	32	0
Bern 008	320	320	0	0	0	100	320	0	10	0
Bern 009	10	320	0	0	0	0	320	0	320	0
Bern 010	1000	1000	0	0	32	320	320	0	10	0
Bern 012	100	100	0	0	0	10	10	0	0	0
Bern 016	0	0	0	0	0	0	10	0	10	0
Bern 017	100	100	0	10	0	32	32	0	32	0

	IgG					IgG/IgG ₄				
Bern 018	1000	1000	0	100	100	1000	1000	0	100	320
Bern 019	1000	1000	0	100	1000	1000	1000	0	100	1000
Bern 020	32	100	0	1000	0	32	100	0	1000	0
Bern 021	320	1000	0	32	0	1000	1000	0	32	0
Bern 024	320	1000	0	100	0	3200	3200	0	100	0
Bern 025	10	100	0	100	0	100	100	0	100	0
Bern 027	10	100	0	32	0	32	100	0	100	0
Bern 028	100	320	0	0	320	1000	1000	0	0	320
Bern 031	10	32	0	320	0	10	32	0	320	0
Bern 032	320	320	0	1000	100	1000	1000	0	1000	320
Bern 033	320	320	0	100	100	1000	1000	0	100	1000
Bern 035	0	32	0	100	0	100	100	0	100	0
Bern 036	320	1000	0	320	320	3200	3200	0	320	320
Bern 037	320	1000	0	100	1000	3200	3200	0	100	1000
Bern 039	1000	3200	0	320	320	3200	3200	0	320	320
Bern 040	320	1000	0	1000	1000	1000	1000	0	320	1000
Sofia 100	100	1000	0	1000	0	1000	1000	0	1000	0
Sofia 101	0	100	0	0	0	100	1000	0	10	0
Sofia 103	0	32	0	100	0	0	32	0	100	0
Sofia 104	100	1000	0	3200	100	1000	1000	0	3200	100
Sofia 105	10	100	0	1000	0	10	100	0	1000	0
Sofia 106	0	0	0	10	0	0	10	0	10	0
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Bern 018	1000	1000	0	0	100	1000	1000	0	32	320
Bern 019	1000	1000	0	0	320	1000	1000	0	10	1000
Bern 020	100	100	0	0	0	32	100	0	1000	0
Bern 021	1000	1000	0	0	0	1000	1000	0	32	0
Bern 024	3200	3200	0	0	0	3200	3200	0	100	0
Bern 025	100	100	0	0	0	100	100	0	100	0
Bern 027	100	100	0	0	0	32	100	0	32	0
Bern 028	1000	1000	0	0	100	3200	3200	0	0	1000
Bern 031	0	0	0	0	0	10	32	0	320	0
Bern 032	1000	1000	0	320	100	1000	3200	0	1000	1000
Bern 033	1000	320	0	0	320	1000	1000	0	100	1000
Bern 035	100	100	0	0	0	10	32	0	100	0
Bern 036	1000	1000	0	0	100	3200	3200	0	100	320
Bern 037	1000	1000	0	0	320	3200	3200	0	100	1000
Bern 039	1000	1000	0	0	100	1000	1000	0	320	320
Bern 040	320	320	0	0	32	1000	1000	0	1000	320
Sofia 100	320	1000	0	0	0	1000	1000	0	1000	0
Sofia 101	100	320	32	0	0	100	100	32	0	0
Sofia 103	0	10	0	10	0	0	10	0	100	0
Sofia 104	1000	1000	0	100	100	320	320	0	1000	320
Sofia 105	10	10	0	10	0	0	32	0	100	0
Sofia 106	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0

	IgG					IgG/IgG ₄				
Sofia 107	0	32	0	32	0	0	32	0	100	0
Sofia 108	0	100	0	1000	0	32	100	0	1000	0
Sofia 110	320	1000	0	1000	320	1000	1000	0	1000	320
Sofia 111	100	1000	0	10	0	100	1000	0	100	0
Sofia 112	10	100	0	1000	0	10	100	0	3200	0
Sofia 113	100	100	0	1000	100	1000	100	0	1000	100
Sofia 114	10	100	0	1000	0	10	100	0	1000	0
Sofia 115	0	32	0	100	0	10	32	0	100	0
Sofia 116	0	32	0	10	0	0	32	0	10	0
Sofia 117	100	1000	0	0	0	1000	1000	0	10	0
Sofia 118	0	100	0	320	0	0	100	0	320	0
Sofia 119	0	100	0	1000	0	10	320	0	3200	0
Sofia 121	100	100	0	100	320	3200	3200	0	3200	1000
Sofia 122	100	1000	0	3200	0	320	1000	0	3200	0
Sofia 124	100	1000	0	100	0	320	1000	0	100	0
Sofia 125	0	10	0	10	0	0	10	0	10	0
Sofia 126	0	320	0	10	0	0	320	0	0	0
Sofia 127	0	32	0	100	0	10	32	0	100	0
Sofia 130	0	100	0	10	0	10	100	0	10	0
Sofia 131	0	0	0	32	0	0	10	0	32	0
Sofia 132	0	100	0	100	0	0	100	0	320	0
Sofia 133	10	320	0	10	0	100	320	0	10	0
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Sofia 107	10	10	0	0	0	0	32	0	100	0
Sofia 108	32	100	0	0	0	32	100	0	1000	0
Sofia 110	3200	3200	0	0	100	3200	3200	0	10	320
Sofia 111	1000	1000	0	0	0	100	1000	0	10	0
Sofia 112	100	100	0	100	0	10	100	0	3200	0
Sofia 113	1000	1000	0	0	32	100	1000	0	100	100
Sofia 114	0	0	0	0	0	32	100	0	320	0
Sofia 115	32	32	0	0	0	10	10	0	10	0
Sofia 116	10	10	0	0	0	0	10	0	0	0
Sofia 117	1000	1000	0	0	0	1000	1000	0	0	0
Sofia 118	0	10	0	0	0	10	100	0	100	0
Sofia 119	100	100	0	100	0	32	100	0	1000	0
Sofia 121	3200	3200	0	0	320	3200	3200	0	1000	1000
Sofia 122	1000	1000	0	100	32	1000	1000	0	3200	0
Sofia 124	1000	1000	0	0	0	1000	1000	0	100	0
Sofia 125	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sofia 126	10	32	0	0	0	10	320	0	10	0
Sofia 127	0	0	0	0	0	0	10	0	100	0
Sofia 130	32	32	0	0	0	0	100	0	0	0
Sofia 131	0	10	0	0	0	0	0	0	32	0
Sofia 132	32	100	0	32	0	0	100	0	320	0
Sofia 133	1000	1000	0	0	0	100	1000	0	0	0

	IgG					IgG/IgG ₄				
Sofia 134	0	10	0	100	0	0	10	0	100	0
Sofia 136	100	1000	0	10	320	1000	1000	0	10	1000
Sofia 137	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0
Sofia 138	0	100	0	100	0	0	100	0	100	0
Sofia 139	10	320	0	100	0	10	320	0	100	0
Sofia 140	10	100	0	100	0	10	100	0	100	0
Sofia 141	1000	1000	0	100	1000	3200	3200	0	100	1000
Sydney 003	0	10	0	10	0	0	0	0	10	0
Sydney 005	100	320	0	10	100	1000	1000	0	10	100
Sydney 009	100	1000	0	10	100	320	1000	0	10	100
Sydney 018	0	32	0	0	0	0	100	0	10	0
Posen 002	0	320	0	1000	0	32	1000	0	1000	0
Posen 008	1000	1000	0	1000	32	3200	3200	0	1000	100
Posen 010	10	100	0	320	0	0	100	0	320	0
Posen 011	0	10	0	100	0	0	10	0	100	0
Posen 012	0	10	0	100	0	0	100	0	100	0
Posen 014	0	32	0	32	0	0	32	0	32	0
Posen 016	0	1000	0	3200	0	0	1000	0	3200	0
Posen 021	100	100	0	100	100	3200	3200	0	100	1000
Posen 024	320	320	0	1000	320	3200	3200	0	1000	100
Posen 025	0	1000	0	1000	0	32	1000	0	1000	0
Posen 026	10	100	0	100	0	100	320	0	100	0
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Sofia 134	0	10	0	0	0	0	10	0	100	0
Sofia 136	1000	1000	0	0	32	1000	1000	0	10	1000
Sofia 137	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
Sofia 138	0	0	0	0	0	0	10	0	100	0
Sofia 139	10	100	0	0	0	10	100	0	100	0
Sofia 140	10	100	0	0	0	10	100	0	100	0
Sofia 141	3200	3200	0	0	1000	3200	3200	0	100	1000
Sydney 003	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
Sydney 005	3200	3200	0	0	100	1000	1000	0	10	320
Sydney 009	1000	1000	0	0	10	100	320	0	10	100
Sydney 018	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Posen 002	100	100	0	10	0	32	100	0	1000	0
Posen 008	3200	3200	0	320	320	3200	3200	0	1000	100
Posen 010	0	0	0	0	0	10	32	0	100	0
Posen 011	0	10	0	32	0	0	10	0	100	0
Posen 012	32	100	0	0	0	0	10	0	100	0
Posen 014	10	32	0	0	0	0	10	0	32	0
Posen 016	0	0	0	0	0	10	320	0	3200	0
Posen 021	3200	3200	0	0	1000	3200	3200	0	100	1000
Posen 024	3200	3200	0	10	320	1000	1000	0	320	1000
Posen 025	100	1000	0	0	0	32	1000	0	320	0
Posen 026	100	100	0	0	0	100	100	0	100	0

	IgG					IgG/IgG ₄				
Posen 027	10	100	100	100	0	100	100	100	100	0
Posen 028	10	100	0	320	0	10	320	0	320	0
Posen 029	100	1000	0	320	0	100	1000	0	320	0
Posen 031	100	1000	0	32	0	1000	1000	0	32	0
Posen 036	0	100	0	320	0	10	100	0	320	0
Posen 037	0	100	0	32	0	10	100	0	100	0
Posen 039	0	100	0	100	0	0	100	0	100	0
Posen 040	10	100	0	100	0	320	1000	0	100	0
Posen 041	0	100	0	10	0	0	100	0	10	0
Posen 042	10	100	0	100	0	10	100	0	100	0
Posen 043	10	320	0	100	0	100	320	0	100	0
Posen 044	0	320	0	320	0	10	100	0	320	0
Posen 046	100	320	0	100	0	1000	1000	0	100	0
Posen 050	0	100	0	320	0	0	100	0	320	0
Posen 051	0	100	0	320	0	0	100	0	320	0
Posen 052	0	100	0	1000	0	10	100	0	1000	0
Posen 054	0	100	0	100	0	10	100	0	100	0
Posen 056	320	1000	0	100	320	1000	1000	0	320	320
Posen 057	0	100	0	100	0	10	100	0	100	0
Posen 061	0	100	0	320	0	10	100	0	320	0
Posen 062	100	100	0	100	100	1000	1000	0	100	100
Posen 063	0	100	0	320	0	100	320	0	320	0
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Posen 027	100	100	100	0	0	10	100	100	100	0
Posen 028	32	32	0	32	0	10	32	0	320	0
Posen 029	100	32	0	0	0	10	100	0	100	0
Posen 031	3200	3200	0	0	0	320	1000	0	10	0
Posen 036	32	32	0	0	0	32	100	0	320	0
Posen 037	0	10	0	0	0	10	100	0	100	0
Posen 039	10	10	0	10	0	0	10	0	100	0
Posen 040	1000	1000	0	0	100	100	1000	0	32	100
Posen 041	0	0	0	0	0	0	100	0	10	0
Posen 042	10	100	0	0	0	0	100	0	100	0
Posen 043	100	100	0	0	0	10	320	0	100	0
Posen 044	10	100	0	0	0	10	100	0	320	0
Posen 046	1000	1000	0	0	10	1000	320	0	100	10
Posen 050	0	0	0	0	0	10	10	0	320	0
Posen 051	0	0	0	0	0	0	10	0	320	0
Posen 052	0	0	0	0	0	0	100	0	1000	0
Posen 054	32	100	0	0	0	10	100	0	100	0
Posen 056	320	100	0	0	100	1000	3200	0	10	320
Posen 057	100	100	0	0	0	10	100	0	100	0
Posen 061	100	100	0	0	0	10	100	0	320	0
Posen 062	3200	3200	0	0	32	3200	3200	0	100	32
Posen 063	100	100	0	10	0	32	100	0	320	0

	IgG					IgG/IgG ₄				
Posen 064	0	100	0	320	0	10	100	0	320	0
Posen 065	10	100	0	10	0	10	100	0	10	0
Posen 066	100	100	0	100	0	320	320	0	100	0
Posen 067	100	320	0	320	320	1000	1000	0	320	320
Posen 070	10	32	0	0	0	10	32	0	10	0
Posen 071	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0
Posen 072	10	10	0	10	0	100	100	0	0	0
Posen 073	100	100	0	1000	0	1000	1000	0	1000	32
Posen 075	0	100	0	100	0	100	0	0	100	0
Posen 076	100	320	0	1000	0	1000	1000	0	1000	32
Posen 077	100	320	0	10	0	320	1000	0	10	0
Posen 081	100	320	0	320	0	100	320	0	320	0
Posen 082	10	100	0	1000	0	10	320	0	1000	0
Posen 083	10	100	0	3200	0	10	100	0	3200	0
Posen 084	0	100	0	320	0	10	100	0	320	0
Posen 085	100	1000	0	320	320	3200	3200	0	320	320
Warschau 002	0	1000	0	1000	0	100	1000	0	1000	0
Warschau 003	10	1000	0	320	0	\	\	\	\	\
Warschau 004	10	1000	0	1000	0	100	1000	0	1000	0
Warschau 005	100	1000	0	10	0	100	1000	0	100	0
Warschau 007	10	10	0	100	0	10	100	0	100	0
Warschau 008	0	100	0	320	0	10	100	0	320	0
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Posen 064	10	10	0	0	0	0	100	0	320	0
Posen 065	0	0	0	0	0	10	100	0	0	0
Posen 066	320	320	0	0	0	100	320	0	100	0
Posen 067	3200	3200	0	0	100	3200	1000	0	320	1000
Posen 070	10	10	0	0	0	10	100	0	0	0
Posen 071	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
Posen 072	320	320	0	0	0	10	100	0	0	0
Posen 073	3200	3200	0	0	100	1000	1000	0	320	320
Posen 075	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
Posen 076	3200	3200	0	100	100	1000	1000	0	1000	100
Posen 077	1000	1000	0	0	0	100	1000	0	0	0
Posen 081	320	320	0	100	0	100	1000	0	320	0
Posen 082	100	100	0	10	0	10	100	0	320	0
Posen 083	0	0	0	0	0	32	1000	0	1000	0
Posen 084	100	100	0	32	0	10	100	0	320	0
Posen 085	1000	1000	0	0	100	1000	1000	0	320	1000
Warschau 002	100	320	0	0	0	10	100	0	1000	0
Warschau 003	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\
Warschau 004	1000	1000	0	10	10	1000	1000	0	1000	0
Warschau 005	320	320	0	0	0	100	1000	0	100	0
Warschau 007	10	10	0	0	0	10	10	0	32	0
Warschau 008	10	32	0	10	0	0	100	0	100	0

	IgG					IgG/IgG ₄				
Warschau 009	100	1000	0	3200	100	1000	3200	0	3200	100
Warschau 010	100	1000	0	320	0	320	1000	0	320	0
Warschau 011	320	1000	0	3200	1000	3200	3200	0	3200	1000
Warschau 012	100	1000	0	1000	1000	1000	1000	0	1000	1000
Warschau 013	100	100	0	320	100	1000	1000	0	320	100
Warschau 014	100	100	0	100	0	320	320	0	100	0
Warschau 019	100	1000	0	1000	0	320	1000	0	1000	0
Warschau 024	0	1000	0	1000	0	0	1000	0	1000	0
Warschau 027	0	100	0	1000	0	0	320	0	3200	0
Warschau 028	0	1000	0	3200	0	100	1000	0	3200	0
Warschau 030	10	100	0	3200	0	10	100	10	3200	0
Warschau 033	100	320	0	1000	0	320	320	0	1000	0
Warschau 036	320	320	0	100	320	\	\	\	\	\
Warschau 037	0	100	0	320	0	0	100	0	320	0
Warschau 042	320	320	0	320	100	3200	3200	0	320	100
Warschau 045	10	320	0	3200	0	100	1000	0	3200	0
Warschau 052	320	320	0	10	100	320	320	0	10	320
Warschau 053	10	100	0	1000	0	10	100	0	1000	0
Warschau 055	100	100	0	100	10	100	100	0	100	10
Warschau 056	100	1000	0	320	320	1000	1000	0	320	320
Warschau 059	10	100	0	1000	0	100	320	0	3200	0
Warschau 060	100	320	0	1000	0	100	320	0	1000	0
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Warschau 009	1000	1000	0	100	10	1000	1000	0	1000	100
Warschau 010	1000	1000	0	0	0	100	1000	0	320	0
Warschau 011	3200	3200	0	10	1000	3200	3200	0	1000	1000
Warschau 012	3200	3200	0	0	100	3200	3200	0	1000	1000
Warschau 013	1000	1000	0	0	100	100	1000	0	100	320
Warschau 014	1000	1000	0	0	32	1000	320	0	100	0
Warschau 019	320	1000	0	0	0	320	1000	0	320	0
Warschau 024	0	0	0	10	0	0	1000	0	1000	0
Warschau 027	0	0	0	0	0	100	320	0	1000	0
Warschau 028	100	100	0	320	0	100	1000	0	3200	0
Warschau 030	0	32	0	1000	0	0	32	0	1000	0
Warschau 033	320	320	0	100	10	100	100	0	1000	0
Warschau 036	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\
Warschau 037	0	0	0	0	0	10	32	0	100	0
Warschau 042	3200	3200	0	0	320	3200	3200	0	100	320
Warschau 045	100	100	0	0	0	100	100	0	1000	0
Warschau 052	320	100	0	0	32	100	320	0	10	320
Warschau 053	0	0	0	0	0	0	10	0	100	0
Warschau 055	100	100	0	0	0	100	100	0	100	10
Warschau 056	1000	1000	0	0	320	1000	1000	0	320	1000
Warschau 059	320	320	0	320	0	100	100	0	1000	0
Warschau 060	320	320	0	100	0	100	320	0	320	0

	IgG					IgG/IgG ₄				
Warschau 061	320	320	0	32	100	1000	1000	0	32	320
Warschau 062	1000	1000	0	320	1000	1000	1000	0	320	1000
Warschau 063	10	100	0	1000	0	10	100	0	1000	0
Warschau 064	32	100	0	320	0	100	100	0	320	0
Warschau 065	320	320	0	100	320	1000	1000	0	100	320
Warschau 068	0	100	0	32	0	0	100	0	32	0
Warschau 069	10	320	0	1000	0	10	320	0	1000	0
Warschau 070	1000	1000	0	320	1000	3200	3200	0	1000	3200
Warschau 071	10	100	0	320	0	10	100	0	320	0
Warschau 072	10	100	0	320	0	0	100	0	320	0
Warschau 073	10	320	0	3200	0	100	320	0	3200	0
Warschau 074	0	100	0	320	0	0	100	0	320	0
Warschau 075	0	100	0	100	0	10	100	0	100	0
Tel Aviv 002	100	320	0	1000	100	3200	3200	0	1000	100
Tel Aviv 004	320	1000	0	1000	1000	1000	1000	0	1000	1000
Tel Aviv 005	100	100	0	1000	32	1000	1000	0	1000	32
Tel Aviv 007	0	100	0	320	0	0	100	0	1000	0
Tel Aviv 010	0	100	0	100	0	0	100	0	100	0
Tel Aviv 017	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0
Tel Aviv 022	100	320	0	320	10	1000	1000	0	320	100
Tel Aviv 023	320	320	0	100	100	3200	3200	0	100	1000
Tel Aviv 024	10	100	0	320	0	32	320	0	320	0
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Warschau 061	1000	1000	0	0	100	1000	1000	0	10	320
Warschau 062	1000	1000	0	0	100	3200	3200	0	100	1000
Warschau 063	0	10	0	320	0	10	100	0	1000	0
Warschau 064	100	100	0	10	0	10	100	0	100	0
Warschau 065	1000	320	0	0	32	1000	1000	0	10	320
Warschau 068	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Warschau 069	100	100	0	10	0	10	320	0	320	0
Warschau 070	3200	3200	0	0	1000	3200	3200	0	100	3200
Warschau 071	0	0	0	0	0	0	10	0	100	0
Warschau 072	0	0	0	0	0	0	10	0	100	0
Warschau 073	100	320	0	1000	0	100	320	0	3200	0
Warschau 074	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0
Warschau 075	10	100	0	0	0	10	100	0	32	0
Tel Aviv 002	3200	3200	0	0	320	3200	3200	0	1000	1000
Tel Aviv 004	1000	1000	0	0	100	1000	1000	0	1000	3200
Tel Aviv 005	1000	1000	0	0	100	320	1000	0	1000	100
Tel Aviv 007	10	10	0	0	0	0	100	0	100	0
Tel Aviv 010	10	0	0	0	0	0	100	0	100	0
Tel Aviv 017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tel Aviv 022	1000	1000	0	0	100	320	1000	0	100	100
Tel Aviv 023	3200	3200	0	0	320	3200	3200	0	10	1000
Tel Aviv 024	320	320	0	0	0	32	320	0	320	0

	IgG					IgG/IgG ₄				
Tel Aviv 025	10	320	0	320	0	10	320	0	320	0
Tel Aviv 028	10	100	0	1000	0	100	1000	0	1000	0
Tel Aviv 029	0	320	0	1000	0	0	320	0	1000	0
Tel Aviv 037	320	1000	0	100	100	1000	1000	0	100	100
Tel Aviv 038	320	1000	0	100	320	3200	3200	0	100	1000
Tel Aviv 039	1000	1000	0	1000	1000	3200	3200	0	1000	1000
Tel Aviv 040	320	1000	0	3200	0	1000	1000	0	3200	0
Tel Aviv 042	100	320	0	320	0	3200	1000	0	320	32
Tel Aviv 044	0	10	0	100	10	10	10	0	100	10
Tel Aviv 046	0	100	0	100	0	0	100	0	100	0
Tel Aviv 048	0	100	0	100	0	0	100	0	100	0
Tel Aviv 049	0	100	0	10	0	0	100	0	10	0
Tel Aviv 050	0	100	0	320	0	10	100	0	320	0
Tel Aviv 053	320	320	0	320	320	1000	1000	0	1000	1000
Tel Aviv 056	0	100	0	100	0	10	100	0	100	0
Tel Aviv 057	100	1000	0	320	0	1000	1000	0	1000	0
Tel Aviv 064	1000	1000	0	1000	320	3200	3200	0	1000	1000
Tel Aviv 065	100	1000	0	3200	0	320	1000	0	3200	0
Tel Aviv 069	1000	1000	0	320	100	3200	3200	0	320	100
Tel Aviv 070	100	1000	0	320	0	1000	1000	0	320	0
Tel Aviv 071	320	1000	0	1000	1000	1000	1000	0	1000	1000
Tel Aviv 072	10	100	0	10	0	10	100	0	10	10
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Tel Aviv 025	32	32	0	0	0	32	320	0	32	0
Tel Aviv 028	1000	1000	0	10	0	320	1000	0	320	0
Tel Aviv 029	0	0	0	0	0	0	100	0	1000	0
Tel Aviv 037	1000	1000	0	0	10	1000	1000	0	32	320
Tel Aviv 038	3200	3200	0	0	100	3200	3200	0	100	1000
Tel Aviv 039	3200	3200	0	0	320	3200	3200	0	320	1000
Tel Aviv 040	1000	1000	0	0	0	3200	3200	0	3200	0
Tel Aviv 042	3200	3200	0	0	100	1000	1000	0	100	32
Tel Aviv 044	0	0	0	0	0	0	10	0	32	0
Tel Aviv 046	0	10	0	0	0	10	100	0	100	0
Tel Aviv 048	0	0	0	0	0	10	320	0	100	0
Tel Aviv 049	32	32	0	0	0	0	100	0	10	0
Tel Aviv 050	0	0	0	0	0	0	10	0	100	0
Tel Aviv 053	1000	1000	0	0	100	3200	3200	0	100	320
Tel Aviv 056	32	100	0	0	0	0	100	0	10	0
Tel Aviv 057	1000	1000	0	0	0	320	1000	0	320	0
Tel Aviv 064	3200	3200	0	0	1000	3200	3200	0	1000	3200
Tel Aviv 065	320	320	0	0	0	100	320	0	3200	0
Tel Aviv 069	1000	1000	0	0	1000	3200	3200	0	100	1000
Tel Aviv 070	1000	1000	0	10	32	1000	1000	0	100	10
Tel Aviv 071	1000	1000	0	0	100	1000	1000	0	100	1000
Tel Aviv 072	10	10	0	0	0	10	100	0	0	10

	IgG					IgG/IgG ₄				
Tel Aviv 073	100	1000	0	100	0	100	1000	0	100	0
Tel Aviv 074	100	1000	0	1000	320	3200	3200	0	1000	320
Tel Aviv 079	100	1000	0	3200	0	100	1000	0	3200	0
Tel Aviv 080	100	1000	0	1000	0	320	1000	0	1000	0
Tel Aviv 083	100	320	0	10	0	100	320	0	10	0
Tel Aviv 086	10	100	100	10	0	10	100	100	10	0
Lübeck 002	100	1000	0	100	100	1000	1000	0	100	100
Lübeck 003	10	100	0	320	0	10	100	0	320	0
Lübeck 004	100	1000	0	1000	0	1000	1000	0	1000	0
Lübeck 007	320	1000	0	320	320	3200	3200	0	320	1000
Lübeck 008	0	100	0	100	0	0	100	0	100	0
Lübeck 009	100	1000	0	320	0	100	1000	0	320	0
Lübeck 010	10	100	0	10	0	10	100	0	10	0
Lübeck 074	100	320	0	100	0	1000	1000	0	100	0
Lübeck 075	0	100	0	10	0	0	320	0	100	0
Lübeck 093	320	1000	0	320	320	3200	3200	0	320	1000
Lübeck 126	320	1000	0	320	100	3200	3200	0	320	100
Lübeck 144	0	100	0	10	0	10	100	0	10	0
Lübeck 177	10	100	0	100	0	10	100	0	100	0
Lübeck 182	0	0	0	100	0	0	10	0	100	0
Lübeck 202	0	320	0	1000	0	10	320	0	1000	0
Lübeck 218	100	100	0	32	0	320	100	0	32	0
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Tel Aviv 073	100	100	0	0	0	100	1000	0	32	0
Tel Aviv 074	3200	3200	0	0	3200	3200	3200	0	320	1000
Tel Aviv 079	320	320	0	0	0	100	1000	0	3200	0
Tel Aviv 080	10	10	0	0	0	100	1000	0	100	0
Tel Aviv 083	10	100	0	0	0	10	1000	0	0	0
Tel Aviv 086	100	100	0	0	0	10	10	0	10	0
Lübeck 002	1000	1000	0	0	32	1000	1000	0	100	320
Lübeck 003	100	100	0	10	0	10	100	0	100	0
Lübeck 004	1000	1000	0	10	32	1000	1000	0	320	0
Lübeck 007	3200	3200	0	0	100	1000	1000	0	100	1000
Lübeck 008	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0
Lübeck 009	100	1000	0	10	0	100	1000	0	100	0
Lübeck 010	0	10	0	0	0	0	100	0	0	0
Lübeck 074	1000	1000	0	10	0	320	320	0	100	0
Lübeck 075	10	100	0	0	0	10	100	0	10	0
Lübeck 093	3200	3200	0	0	1000	3200	3200	0	320	1000
Lübeck 126	3200	3200	0	0	100	3200	3200	0	100	100
Lübeck 144	10	100	0	0	0	0	100	0	10	0
Lübeck 177	32	32	0	0	0	10	100	0	100	0
Lübeck 182	0	0	0	0	0	0	10	0	100	0
Lübeck 202	10	320	0	0	0	10	1000	0	1000	0
Lübeck 218	320	320	0	0	10	100	320	0	10	0

	IgG					IgG/IgG ₄				
Lübeck 220	10	100	0	100	0	10	100	0	100	0
Lübeck 221	0	32	0	100	0	10	32	0	100	0
Lübeck 222	10	100	0	100	0	10	100	0	100	0
Lübeck 223	10	100	0	320	0	10	100	0	320	0
Lübeck 225	0	32	0	10	0	32	100	0	10	0
Lübeck 227	10	100	0	1000	0	10	100	0	1000	0
Lübeck 229	10	100	0	10	0	100	100	0	10	0
Lübeck 231	0	100	0	100	0	10	100	0	100	0
Lübeck 232	0	100	0	100	0	0	100	0	100	0
Lübeck 233	0	100	0	1000	0	0	100	0	1000	0
Lübeck 235	320	1000	0	1000	320	3200	3200	0	1000	1000
Lübeck 236	10	100	0	320	0	100	100	0	1000	0
Lübeck 240	1000	1000	0	320	320	3200	1000	0	320	320
Lübeck 301	10	100	0	100	0	100	100	0	100	0
Lübeck 305	10	100	0	320	0	100	100	0	320	0
Lübeck 307	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0
Lübeck 309	0	100	0	1000	0	10	100	0	1000	0
Lübeck 311	10	100	0	10	0	100	100	0	10	0
Lübeck 312	10	100	0	10	0	10	100	0	10	0
Lübeck 313	0	100	0	100	0	10	100	0	100	0
Lübeck 318	100	1000	0	10	0	320	1000	0	10	0
Lübeck 319	100	100	0	100	0	1000	1000	0	100	320
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Lübeck 220	32	32	0	0	0	10	10	0	100	0
Lübeck 221	10	10	0	0	0	10	100	0	10	0
Lübeck 222	10	10	0	0	0	10	100	0	100	0
Lübeck 223	0	0	0	10	0	0	100	0	100	0
Lübeck 225	100	100	0	0	0	10	100	0	0	0
Lübeck 227	32	100	0	100	0	10	100	0	320	0
Lübeck 229	100	100	0	0	0	10	100	0	10	0
Lübeck 231	100	100	0	32	0	100	100	0	100	0
Lübeck 232	0	10	0	0	0	10	32	0	32	0
Lübeck 233	0	0	0	0	0	0	32	0	100	0
Lübeck 235	1000	1000	0	0	320	1000	1000	0	100	1000
Lübeck 236	100	100	0	10	0	10	100	0	100	0
Lübeck 240	1000	1000	0	0	100	1000	1000	0	100	320
Lübeck 301	1000	1000	0	0	0	100	100	0	100	0
Lübeck 305	1000	1000	0	0	0	100	100	0	100	0
Lübeck 307	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
Lübeck 309	0	0	0	0	0	0	32	0	320	0
Lübeck 311	100	100	0	0	0	100	100	0	10	0
Lübeck 312	0	10	0	0	0	100	100	0	10	0
Lübeck 313	32	100	0	0	0	10	100	0	10	0
Lübeck 318	320	1000	0	0	0	1000	1000	0	10	0
Lübeck 319	1000	1000	0	0	100	1000	1000	0	100	100

	IgG					IgG/IgG ₄				
Lübeck 320	1000	1000	0	1000	1000	3200	3200	0	1000	1000
Peking 001	100	320	0	100	100	100	320	0	100	100
Peking 002	100	100	0	100	100	320	1000	0	100	100
Peking 008	0	10	0	10	0	0	100	0	100	0
Peking 016	100	100	0	0	100	320	320	0	0	100
Peking 017	100	320	0	100	320	1000	1000	0	100	320
Peking 018	100	100	0	320	100	1000	1000	0	320	100
Peking 019	10	320	0	100	0	100	320	0	100	0
Peking 020	10	100	10	100	0	10	100	0	100	0
Peking 023	0	320	0	320	0	0	320	0	320	0
Peking 025	320	1000	0	1000	1000	1000	1000	0	1000	1000
Peking 026	0	100	0	10	0	10	100	0	10	0
Peking 028	100	1000	0	1000	320	1000	1000	0	1000	1000
Peking 031	0	100	0	0	0	0	100	0	0	10
Peking 032	0	100	0	320	0	0	100	0	320	0
Brünn 001	0	10	0	10	0	0	10	0	10	0
Brünn 003	100	1000	0	1000	0	3200	3200	0	3200	0
Brünn 004	0	100	10	10	0	100	100	10	10	0
Brünn 005	0	100	0	320	0	0	100	0	320	0
Brünn 006	10	100	0	100	0	100	100	0	100	0
Brünn 008	10	100	0	320	0	10	100	0	320	0
Brünn 009	100	320	0	100	320	320	320	0	100	320
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Lübeck 320	1000	1000	0	0	100	3200	3200	0	320	1000
Peking 001	320	320	0	0	10	100	320	0	10	100
Peking 002	1000	1000	0	0	32	320	1000	0	100	320
Peking 008	0	10	0	0	0	0	10	0	10	0
Peking 016	320	100	0	0	10	320	320	0	0	100
Peking 017	3200	3200	0	0	100	1000	1000	0	100	1000
Peking 018	1000	1000	0	0	100	1000	1000	0	100	320
Peking 019	100	100	0	0	0	100	100	0	100	0
Peking 020	100	100	0	0	0	32	100	0	100	0
Peking 023	10	10	0	0	0	10	100	0	100	0
Peking 025	1000	1000	0	0	320	1000	1000	0	1000	1000
Peking 026	0	0	0	0	0	0	10	0	10	0
Peking 028	1000	1000	0	10	100	1000	1000	0	320	1000
Peking 031	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
Peking 032	10	10	0	10	0	0	100	0	100	0
Brünn 001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Brünn 003	3200	3200	0	100	100	3200	3200	0	3200	0
Brünn 004	100	100	0	0	0	10	100	0	10	0
Brünn 005	100	100	0	0	0	10	100	0	100	0
Brünn 006	100	100	0	10	0	10	100	0	100	0
Brünn 008	10	10	0	0	0	0	100	0	320	0
Brünn 009	320	100	0	0	10	320	320	0	100	320

	IgG					IgG/IgG ₄				
Brünn 010	100	320	0	100	100	320	320	0	320	320
Brünn 011	100	320	0	10	0	100	320	0	10	0
Brünn 012	0	100	0	320	0	100	320	0	320	0
Brünn 014	10	100	0	320	0	100	100	0	320	0
Brünn 015	10	100	0	100	0	100	320	0	100	0
Brünn 016	100	320	0	0	0	1000	1000	0	10	0
Brünn 017	0	320	0	1000	0	0	320	0	1000	0
Brünn 018	100	100	0	100	100	320	100	0	100	100
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Brünn 010	100	100	0	0	0	100	320	0	100	100
Brünn 011	100	100	0	0	0	0	100	0	10	0
Brünn 012	100	100	0	0	0	10	100	0	100	0
Brünn 014	100	100	0	0	0	10	100	0	100	0
Brünn 015	100	100	0	0	0	100	320	0	32	0
Brünn 016	1000	1000	0	0	0	320	320	0	0	0
Brünn 017	10	10	0	0	0	10	100	0	100	0
Brünn 018	320	100	0	0	10	100	100	0	32	100
Verdacht auf bullöses Pemphigoid										
	IgG					IgG/IgG ₄				
Thessaloniki 027	0	100	0	0	0	10	100	0	0	0
Thessaloniki 047	10	100	0	0	0	10	100	0	0	0
Rom 049	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
Antalya 055	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0
Antalya 090	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0
Belgrad 001	100	320	0	0	0	100	320	0	0	0
Bern 030	0	10	0	0	0	10	10	0	0	0
Sofia 123	10	100	0	0	0	10	100	0	0	0
Sofia 135	0	10	0	0	0	10	10	0	0	0
Sofia 142	10	0	0	0	0	0	10	0	0	0
Sydney 022	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0
Posen 001	0	10	0	0	0	0	100	0	0	0
Warschau 058	10	100	0	0	0	100	100	0	0	0
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Thessaloniki 027	10	10	0	0	0	0	100	0	0	0
Thessaloniki 047	10	10	0	0	0	10	100	0	0	0
Rom 049	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Antalya 055	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
Antalya 090	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
Belgrad 001	100	32	0	0	0	100	100	0	0	0
Bern 030	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sofia 123	10	10	0	0	0	10	100	0	0	0
Sofia 135	10	10	0	0	0	0	10	0	0	0
Sofia 142	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
Sydney 022	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
Posen 001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Warschau 058	100	100	0	0	0	32	100	0	0	0

	IgG					IgG/IgG ₄				
Tel Aviv 021	10	320	0	0	0	100	1000	0	0	0
Tel Aviv 041	10	100	0	0	0	10	100	0	0	0
Tel Aviv 047	0	320	0	0	0	100	320	0	0	0
Tel Aviv 060	0	100	0	0	0	0	320	0	0	0
Tel Aviv 075	10	100	0	0	0	32	100	0	0	0
Tel Aviv 087	0	32	0	0	0	10	32	0	0	0
Lübeck 173	320	1000	0	0	0	1000	1000	0	0	0
Lübeck 230	0	320	0	0	0	0	100	0	0	0
Lübeck 242	10	10	0	0		10	10	0	0	0
Peking 011	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0
Brünn 013	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Tel Aviv 021	1000	1000	0	0	0	100	1000	0	0	0
Tel Aviv 041	100	100	0	0	0	10	100	0	0	0
Tel Aviv 047	32	32	0	0	0	10	320	0	0	0
Tel Aviv 060	100	100	0	0	0	10	100	0	0	0
Tel Aviv 075	100	100	0	0	0	10	100	0	0	0
Tel Aviv 087	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lübeck 173	1000	1000	0	0	0	320	1000	0	0	0
Lübeck 230	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lübeck 242	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Peking 011	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Brünn 013	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
Diagnose Lineare IgA-Dermatose										
	IgA									
Thessaloniki 045	32	32	0	0	0					
Rom 057	0	32	0	0	0					
Belgrad 056	10	10	0	0	0					
Belgrad 076	0	100	0	0	0					
Posen 035	100	100	0	10	0					
Lübeck 234	0	10	0	10	0					

Ösophagus BM
 Spalthaut BD
 Spalthaut BB
 Rattenblase BM
 Kollagen Typ VII
 Ösophagus BM
 Spalthaut BD
 Spalthaut BB
 Rattenblase BM
 Kollagen Typ VII

Blasenbodenfluoreszenzen ohne Kollagen Typ VII (Verdacht SHP, Anti-Laminin γ 1/p200 Pemphigoid)										
	IgG					IgG/IgG ₄				
Thessaloniki 014	0	10	10	0	0	0	100	10	0	0
Thessaloniki 062	0	100	100	0	0	0	100	100	0	0
Antalya 072	0	0	100	0	0	10	10	100	0	0
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Thessaloniki 014	0	0	10	0	0	0	100	100	0	0
Thessaloniki 062	10	10	10	0	0	0	100	100	0	0
Antalya 072	10	100	10	0	0	0	0	100	0	0

	IgG					IgG/IgG ₄				
Bern 022	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
Bern 041	0	0	100	0	0	0	0	320	0	0
Sofia 109	0	100	100	0	0	10	100	100	0	0
Sofia 120	0	0	10	0	0	0	0	32	0	0
Sofia 128	0	10	0	0	0	0	10	10	0	0
Sofia 129	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
Sydney 016	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0
Posen 058	0	10	100	0	0	10	10	100	0	0
Posen 078	0	100	100	0	0	10	100	100	0	0
Posen 088	0	0	100	0	0	10	0	100	0	0
Tel Aviv 008	0	32	32	0	0	0	32	32	0	0
Tel Aviv 009	0	10	10	100	0	0	10	10	100	0
Tel Aviv 030	0	0	0	0	0	0	0	32	0	0
Tel Aviv 045	0	32	32	0	0	0	32	32	0	0
Lübeck 226	0	0	100	0	0	10	0	100	0	0
Lübeck 302	10	32	32	100	0	100	100	32	100	0
Peking 014	0	0	100	100	0	10	0	100	100	0
Peking 024	0	100	10	0	0	0	100	100	0	0
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Bern 022	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bern 041	0	32	0	0	0	0	0	100	0	0
Sofia 109	100	100	100	0	0	100	100	100	0	0
Sofia 120	10	0	32	0	0	10	0	10	0	0
Sofia 128	0	0	0	0	0	0	100	10	0	0
Sofia 129	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0
Sydney 016	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0
Posen 058	32	10	0	0	0	0	32	100	0	0
Posen 078	100	100	0	0	0	10	32	0	0	0
Posen 088	10	0	10	0	0	10	0	100	0	0
Tel Aviv 008	0	0	0	0	0	0	10	10	0	0
Tel Aviv 009	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tel Aviv 030	10	0	32	0	0	0	0	32	0	0
Tel Aviv 045	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lübeck 226	0	0	0	0	0	0	0	32	0	0
Lübeck 302	100	100	0	10	0	10	100	0	100	0
Peking 014	10	0	100	0	0	0	0	100	0	0
Peking 024	10	0	10	0	0	10	10	10	0	0
Diagnose Epidermolysis bullosa acquisita										
	IgG					IgG/IgG ₄				
Thessaloniki 065	0	0	0	0	32	0	0	0	0	32
Rom 018	0	0	0	0	320	0	0	0	0	320
Antalya 062	0	0	100	0	320	0	0	100	0	320
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Thessaloniki 065	0	0	0	0	0	0	0	10	0	100
Rom 018	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Antalya 062	0	0	0	0	0	10	0	10	0	100

	IgG					IgG/IgG ₄				
Posen 047	0	10	32	0	10	0	0	32	0	0
	IgG ₄					IgG ₄ → IgG				
Posen 047	10	0	10	0	10	0	0	0	0	0
Diagnose IgA-Epidermolysis bullosa acquisita										
	IgA									
Thessaloniki 048	0	0	0	0	320					

Endomysium IgA
Gliadin IgA
Gliadin IgG
Gliadin IgG/IgG₄
Gliadin IgG₄
Gliadin IgG₄ → IgG

Diagnose Dermatitis herpetiformis						
Thessaloniki 017	100	100	320	320	0	100

Keine Diagnose	
Rom 030	alle Immunfluoreszenzen negativ
Rom 053	leichte Reaktion des ICR im IgG ohne Zielantigene
Antalya 042	alle Immunfluoreszenzen negativ
Antalya 068	alle Immunfluoreszenzen negativ
Antalya 085	alle Immunfluoreszenzen negativ
Sofia 096	alle Immunfluoreszenzen negativ
Sydney 020	leichte Reaktion des ICR im IgG ohne Zielantigene
Sydney 021	alle Immunfluoreszenzen negativ
Posen 019	alle Immunfluoreszenzen negativ
Posen 020	alle Immunfluoreszenzen negativ
Posen 030	alle Immunfluoreszenzen negativ
Posen 074	leichte Reaktion des ICR im IgG ohne Zielantigene
Warschau 016	leichte Reaktion des ICR im IgG ohne Zielantigene
Tel Aviv 011	alle Immunfluoreszenzen negativ
Lübeck 308	leichte Reaktion des ICR im IgG ohne Zielantigene
Lübeck 314	leichte Reaktion des ICR im IgG ohne Zielantigene
Peking 021	leichte Reaktion des ICR im IgG ohne Zielantigene

Zur Wahrung der Übersicht umfasst diese Tabelle eine strukturierte Darstellung der für die jeweilige Diagnose relevanten Fluoreszenzwerte der Patientenseren.

7.4 Materialien

Hilfsmittel & Geräte

Name	Hersteller
<i>EUROIMMUN AG Dassow</i>	
Blistergerät xts-384	Biolab fluidX, Wehrheim
LasOnAll-XS	Östling Marking Systems GmbH, Solingen
Research® plus 100µl	Eppendorf AG, Hamburg
<i>EUROIMMUN AG Groß Grönau</i>	
AXIO Imager.A1	Carl Zeiss AG, Oberkochen
AXIO Scope.A1	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Färbezylinder Hellendahl	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Gram BioLine Laborkühlschrank BioCompact II RR 410	GRAM Deutschland GmbH, Sarstedt
Handy Step® Electronic	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Handy Step® S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Kurzzeitmesser, 63762-TR118	Oregon Scientific, Tualatin, OR, USA
Messbecher mit Henkel 1000ml	BRAND GmbH & Co KG, Wertheim
neoLab-EPRACKS Styroporboxen für 100 Reaktionsgefäße 1,5/2,0ml	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Raumsparkanister, 5L	Bürkle GmbH, Bad Bellingen
Reagenzträger TITERPLANE	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Reax Top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Research® plus 100µl	Eppendorf AG, Hamburg
Styropor-Eindeckhilfe	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck

Ultra Low Temperature Freezer	New Brunswick Scientific, zur Eppendorf AG gehörig, Hamburg
Umluft Tiefkühlschrank UTSD 3702	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß
<i>LIED</i>	
Messzylinder 500ml	VITLAB GmbH, Grossostheim
MR3002 Magnetrührer mit Heizung	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Multipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Opsys MR™ Microplate Reader	Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA
Reaktionsgefäßständer	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Research® 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg
Research® Pipette 300	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc. Bohemia, NY, USA

Verbrauchsmaterial

EUROIMMUN AG Dassow

Easy Pierce 20µm Foil	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig
EuroCup	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Nitril 3000 X-Long Blue Handschuhe	Meditrade GmbH, Kiefersfelden
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Scintillations-Röhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

EUROIMMUN AG Groß Grönau

Deckgläser	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig
------------	--

Dispensertips 0,5ml unsteril	Labsolute® von Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Dispensertips 1,25ml unsteril	Labsolute® von Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Dispensertips Plus 5,0ml unsteril	Labsolute® von Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Extra Soft Multifold Hand Towel	Tork von SCA Hygiene Products AFH Sales GmbH, Mannheim
Gentle Skin Small	Meditrade GmbH, Kiefersfelden
Mikro Schraubröhre 0,5ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Objektträger Dermatology Study UKSH Lübeck SA 133 (5 Mosaik)	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Objektträger Desmocollin Mosaic Dermatology Study SA133	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Pipettenspitzen, 10-200µl, unsteril	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Precision Wipes	KIMBERLY-CLARK GmbH, Irving, TX, USA
Reagenzgläser, glatter Rand, 75 x 12,0 x 1,0mm	ALEMANIA Glas GmbH, Meuselbach- Schwarzühle
SafeSeal Gefäß 1,5ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

LIED

Kombitips advanced 2,5ml	Eppendorf AG, Hamburg
Peha-Soft S	PAUL HARTMANN AG, Heidenheim
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
SaveSeal Gefäß 1,5ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Chemikalien

EUROIMMUN AG Groß Grönu

Absorptionspuffer	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Extran MAO 1 1:20 in Aqua dest.	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Glycerol buffered with PBS, pH 8,4	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Konjugat IgA	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Konjugat IgG	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Konjugat IgG ₄ 1:250	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Konjugat IgG/IgG ₄ 1:850/1:250	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
PBS-Tween	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
<i>LIED</i>	
Ampuwa Spüllösung 1000ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Anti-BP180-NC16A-4X-ELISA (IgG) Testsatz	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Anti-Desmoglein 3-ELISA (IgG) Testsatz	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Software	
EUROPicture	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Microsoft Excel 2013	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
IBM SPSS Statistics 23	IBM Corporation, Armonk, NY, USA

7.5 Votum der Ethikkommission

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an den Patientenseren wurden von der jeweiligen Ethikkommission des Herkunftslandes der Seren positiv evaluiert. Die Sammlung und Nutzung der Lübecker Seren wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck positiv bewertet.

(Aktenzeichen 11-078; Sitzung der Ethikkommission vom 14. Juni 2011 mit Nachreichung vom 11. Juli 2011)

Die Nutzung von 50 randomisierten Blutspenderseren als negative Kontrolle in den oben genannten Untersuchungen wurde ebenfalls durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck positiv bewertet.

(Aktenzeichen 10-094; Sitzung der Ethikkommission vom 18. Mai 2010)

7.6 Publikationen

Fachzeitschriften

- Mindorf S*, Dettmann IM*, **Krüger S***, Fuhrmann T, Rentzsch K, Karl I, Probst C, Komorowski L, Fechner K, van Beek N, Lemcke S, Sárdy M, Bangert C, Benoit S, Hashimoto T, Zillikens D, Pas HH, Jonkman MF, Stöcker W, Schmidt E, International Autoimmune Bullous Diseases Study Group** (2017) Routine detection of serum antidesmocollin autoantibodies is only useful in patients with atypical pemphigus. *Exp Dermatol* 26,1267–1270
- van Beek N, **Krüger S***, Fuhrmann T*, Lemcke S, Goletz S, Probst C, Komorowski L, Di Zenzo G, Dmochowski M, Drenovska K, Horn H, Jedlickova H, Kowalewski C, Medenica L, Murrell D, Patsatsi A, Geller S, Uzun S, Vassileva S, Zhu X, Fechner K, Zillikens D, Stöcker W, Schmidt E, Rentzsch K. Multicenter prospective study on multivariant diagnostics of autoimmune bullous dermatoses using the BIOCHIP™ technology. Submitted.

Vorträge

- *Die diagnostische Relevanz von Anti-Desmocollin-Antikörpern bei Pemphigus-erkrankungen*; 49. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG), Berlin 2017

Poster

- **Krüger S***, Fuhrmann T*, Goletz S, Rentzsch K, Bieber K, Zillikens D, Stöcker W, Schmidt E, Internationale Studiengruppe für bullöse Autoimmundermatosen**. Schnellere und einfachere Diagnostik von bullösen Autoimmunderkrankungen. Uni im Dialog, Universität zu Lübeck 2016
- **Krüger S***, Fuhrmann T*, van Beek N, Probst C, Komorowski L, Lemcke S, Dähnrich C, Schlumberger W, Zillikens D, Stöcker W, Schmidt E, Rentzsch K, International Autoimmune Bullous Diseases Study Group**. Multicenter prospective study on multivariant diagnostics of autoimmune bullous dermatoses using the BIOCHIP™ technology. 4th Scientific Conference of the International Pemphigus & Pemphigoid Foundation (IPPF): Recent Advances in Patient-oriented Research in Pemphigus and Pemphigoid, Lübeck 2017

- **Krüger S***, Fuhrmann T*, van Beek N, Komorowski L, Fechner K, Zillikens D, Stöcker W, Schmidt E, Rentzsch K, International Autoimmune Bullous Diseases Study Group**. Multicenter prospective study on multivariant diagnostics of autoimmune bullous dermatoses using the BIOCHIP™ technology. 47th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research (ESDR), Salzburg 2017
- **Krüger S***, Fuhrmann T*, van Beek N, Probst C, Komorowski L, Lemcke S, Dähnrich C, Schlumberger W, Zillikens D, Stöcker W, Schmidt E, Rentzsch K, International Autoimmune Bullous Diseases Study Group**. Multicenter prospective study on multivariant diagnostics of autoimmune bullous dermatoses using the BIOCHIP™ technology. 2nd Research Workshop Technologies and Resources, Universität zu Lübeck 2017

* **equal contributors**

**** International Autoimmune Bullous Diseases Study Group**

Giovanni Di Zenzo (Rome, Italy), Marian Dmochowski (Poznan, Poland), Kossara Drenovska (Sofia, Bulgaria), Hilayda Güngör (Ankara, Turkey), Michael Horn (Bern, Switzerland), Hana Jedlickova (Brno, Czech Republic), Cezary Kowalewski (Warsaw, Poland), Branka Marinovic (Zagreb, Croatia), Ljiljana Medenica (Belgrade, Serbia), Dedee Murrell (Sydney, Australia), Aikaterini Patsatsi (Thessaloniki, Greece), Eli Sprecher (Tel Aviv, Israel), Soner Uzun (Antalya, Turkey), Snežina Vassileva (Sofia, Bulgaria); Prof. Xuejun Zhu (Beijing, China).

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Enno Schmidt, der mir dieses Thema überließ und mich in der Anfertigung der Arbeit mit vielen hilfreichen Fragestellungen, Ideen und Überlegungen unterstützte.

Ebenfalls danken möchte ich Prof. Dr. med. Detlef Zillikens, Direktor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck, der durch seine hervorragende Forschung in Kombination mit einem herzlichen Team mich und viele weitere Doktorandinnen und Doktoranden wissenschaftlich förderte und fördert. Großer Dank gilt auch Prof. Dr. med. Winfried Stöcker für die selbstverständliche und großzügige Bereitstellung der Laboratorien und Materialien, die mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglichten.

Meiner Mentorin Dr. rer. nat. Stephanie Goletz möchte ich für ihre unerlässliche Hilfsbereitschaft und Mitwirkung, wann und wo immer es ihr möglich war, danken. Hier soll auch die Unterstützung des gesamten Schmidt Lab des LIED dankend genannt sein. Meiner Mentorin Kristin Rentzsch danke ich sehr für ihre im wahrsten Sinne des Wortes immer offene Tür. Es war sehr erfrischend, viele neue Ideen zu vorliegenden Daten zu diskutieren und mit eigenen Ideen immer auf ein offenes Ohr zu stoßen. Genauso gilt mein Dank der Offenherzigkeit des gesamten Teams im Diagnostiklabor der EUROIMMUN AG in Groß Grönu, das mich einarbeitete, immer gerne Fragen beantwortete und mir so eine sehr fruchtbare fünfmonatige Zusammenarbeit ermöglichte.

Dr. med. Maike Holtsche danke ich für die Unterstützung bei den klinischen Fotos, Dr. med. Andreas Recke für die gute Beratung bei statistischen Fragestellungen, Dr. med. Nina van Beek für ihre Hilfe beim Schreiben dieser Arbeit und Dr. rer. nat. Susanne Lemcke und Antje Winter-Keil für die Organisation und Koordination, ohne die diese große Studie nicht möglich gewesen wäre.

Selbstverständlich muss und will ich meinen Eltern danken, die mir durch ihre mein gesamtes Leben begleitende Unterstützung meinen schulischen und universitären Werdegang überhaupt erst ermöglichten und denen daher diese Arbeit gewidmet ist. Zutiefst dankbar bin ich auch meinem Lebenspartner Tarek Fuhrmann. Seine Unterstützung und sein Rückhalt gaben mir viel Antrieb und die Zusammenarbeit mit ihm viel Freude.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Stine Krüger
Geburtsdatum	22. Februar 1993
Geburtsort	Berlin-Zehlendorf
Staatsangehörigkeit	deutsch



Schulbildung

1999 – 2008	Besuch der Waldorfschule Kleinmachnow
Dezember 2008 – August 2009	Besuch der Hartsbrook School in Hadley, Massachusetts, USA
September 2009 – Juni 2012	Besuch des Evangelischen Gymnasiums Hermannswerder in Potsdam (Abschluss: Abitur, Note: 1,0)

Universitäre Ausbildung

Oktober 2012	Beginn des Medizinstudiums an der Universität zu Lübeck
April – Juli 2014	viermonatige Tätigkeit als Histologie-Tutorin in der Anatomie
September 2014	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,0)
Februar 2015	einmonatige Famulatur im hausärztlichen Bereich
August 2015	einmonatige Famulatur in der Hand- und Fuß- und Unfallchirurgie im Agaplesion Diakonie Krankenhaus Hamburg
Oktober 2015 – März 2016	Praktische Arbeit der Dissertation unter Förderung durch die Deutsche Forschungsgesellschaft im GRK1727 „Modulation of Autoimmunity“
März 2016	einmonatige Famulatur im Bereich der Labormedizin im Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie
September 2016	einmonatige Famulatur in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
August 2017	zweiwöchige Famulatur in einer Praxis für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde in Lübeck
April 2018	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)

Praktisches Jahr

Mai 2018 – Juli 2018	zweimonatiger PJ-Abschnitt in der Chirurgischen Klinik im Spital Uster in der Schweiz
Juli 2018 – September 2018	zweimonatiger PJ-Abschnitt in der Allgemein-, Viszeral- & Gefäßchirurgie in der Schön Klinik in Neustadt
September 2018 – Dezember 2018	viermonatiges PJ-Tertial in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde an der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Januar 2019 – April 2019	viermonatiges PJ-Tertial im Bereich der Inneren Medizin in den Medizinischen Kliniken des Sana Klinikums Lübeck