

Aus der Anatomischen Anstalt der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Anatomie – Vegetative Anatomie
Direktor: Prof. Dr. med. Jens Waschke

**“DIE ROLLE VON PLAKOGLOBIN UND DESMOPLAKIN IN DER PATHOGENESE DER
AUTOIMMUNERKRANKUNG PEMPHIGUS VULGARIS”**

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

vorgelegt von
Carina Anja Dehner
aus Regensburg

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Jens Waschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jörg Christoph Prinz
Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Volker Spindler

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hicckel

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2019

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	7
1.1 Epidermis.....	7
1.2 Zell-Zell-Kontakte	7
1.3 Desmosom.....	8
1.3.1 Desmosomale Cadherine.....	10
1.3.2 Desmosomale Plaqueproteine	12
1.3.2.1 Armadillo-Proteine.....	12
1.3.2.2 Desmoplakin.....	14
1.3.3 Zytoskelettverankerung von Desmosomen	15
1.3.4 Desmosomale und extradesmosomale Desmoglein-Haftungskontakte	15
1.4 Pemphigus	16
1.4.1 Klinik.....	16
1.4.2 Pathogenese	20
1.5 p38MAPK.....	22
1.6 Fragestellung	23
2. MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1 Zellkultur	24
2.2 Antikörper und Testreagenzien	25
2.2.1 Farbstoff-gekoppelte Antikörper.....	26
2.2.2 Mediatoren	27
2.2.3 Aufreinigung von pathogenen Anti-Dsg3- / Patientenantikörpern.....	27
2.2.4 Verwendete DNA-Konstrukte	28
2.3 Immunfluoreszenzmikroskopie (IF)	28
2.4 Proteinbestimmung durch Western Blot-Analyse	29
2.4.1 Lysatherstellung.....	29
2.4.2 Proteinbestimmung nach Pierce.....	30
2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blotting.....	30
2.4.4 Proteindetektion	31

2.5 Triton-X-100-vermittelte Proteinextraktion	32
2.6 Zelldissoziationsversuche	32
2.7 „Proximity-Ligation“-Versuch	33
2.8 Immunpräzipitation	33
2.9 Molekularbiologische Methoden	34
2.9.1 Transfektion.....	34
2.9.1.1 Transfektion mit DNA-Konstrukten.....	34
2.9.1.2 Transfektion mit siRNA (small interfering RNA)	35
2.9.2 Transformation von Konstrukten in E. coli-Bakterien.....	35
2.9.3 Präparation von DNA-Konstrukten	36
2.10 Etablierung eines lentiviralen shRNA-Systems	37
2.10.1 shRNA-Design.....	37
2.10.2 Auswahl des Vektor-Systems.....	38
2.10.3 Präparation der DNA.....	38
2.10.4 Anlagerungsprozess	39
2.10.5 Ligation.....	40
2.10.6 Zellklon-Isolierung	40
2.10.7 Virusproduktion	41
2.10.8 Transduktion	41
2.10.9 MOI-Bestimmung.....	42
2.11 Bildaufnahme und Bildbearbeitung.....	43
2.12 Statistik	43
3. ERGEBNISSE	45
3.1 Pemphigus-Autoantikörper führen zur Reduktion des Pg-Spiegels.....	45
3.2 Einfluss von Pg-Depletion auf den p38MAPK-vermittelten Zellhaftungsverlust	46
3.3 Bedeutung des Komplex aus Dsg3, p38MAPK und Pg bei Pemphigus.....	50
3.4 Einfluss von Pg-Depletion auf die Keratinfilament-Retraktion.....	52
3.5 Bedeutung der Lokalisation von Pg für p38MAPK-Aktivität, Zellhaftung, Zytokeratin-Verteilung und Dsg3-Depletion	53

3.6 Die Wirkung der DP-Punktmutante auf die Zelladhäsion in HaCaTs	56
3.7 Effekte der DP-Mutante auf die Keratinfilament-Retraktion und Dsg3- Depletion.....	60
3.8 Bedeutung von PKC für die DP-Phosphorylierung.....	62
3.9 Einfluss der DP-Mutante auf die desmosomale Hyperadhäsion	66
4.DISKUSSION	68
4.1 Die Rolle von Pg und DP bei der Kontrolle der p38MAPK-Aktivität.....	68
4.1.1 Pg-Defizienz führt zu p38MAPK-vermitteltem Zellhaftungsverlust	68
4.1.2 Pg-Defizienz führt zu p38MAPK-vermittelter Keratinfilament-Retraktion.....	69
4.1.3 Pg an der Membran ist protektiv in PV und ist für die Rekrutierung von p38MAPK wichtig.....	69
4.2 Die Rolle einer DP-Punktmutante für die Zellhaftung.....	70
4.2.1 Hemmung der PKC-abhängigen DP-Phosphorylierung verbessert den Zellhaftungsverlust bei Pemphigus	71
4.2.2 Keratinfilamente regulieren die desmosomale Haftung	72
4.3 Ausblick	73
4.4 Zusammenfassung	74
5. BIBLIOGRAPHIE.....	76
5.1 Originalpublikationen	76
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	81
7. DANKSAGUNG.....	84
8. LEBENSLAUF	85

1. Einleitung

1.1 Epidermis

Die Haut des Menschen besteht aus Subcutis, Dermis und Epidermis. Die Epidermis vermittelt als äußerste Schicht die eigentliche Abgrenzung des Körpers gegenüber der Umwelt. Sie ist gefäßfrei und setzt sich zu über 90% aus den eigentlichen Hautzellen, den sogenannten Keratinozyten zusammen. Diese durchlaufen im Zuge ihrer Maturation einen ausgiebigen Differenzierungsprozess bevor sie durch mechanische Belastung abgeschilfert werden. Des Weiteren finden sich in der Epidermis Melanozyten, Langerhans- und Merkel-Zellen [1].

Die Epidermis ist in vier Schichten untergliedert. Die unterste Schicht (Stratum basale) ist für die andauernde Zellerneuerung verantwortlich, wohingegen im darauffliegenden Stratum spinosum schon die Synthese wichtiger Bestandteile für die Verhornung stattfindet. Im Stratum granulosum, der letzten unverhornten Schicht, findet man Keratohyalin granula, welche bereits direkt mit dem Verhornungsprozess assoziiert sind. Die Hornzellen des Stratum corneum, der obersten Schicht, haben bereits ihren Zellkern und ihre Zellorganellen verloren und werden als Einzelzellen abgelöst („Desquamationsphase“), wohingegen von unten ständig neue Zellen nachgeliefert werden. Der Zeitraum von der Entstehung eines neuen Keratinozyten bis zu dessen Abschilferung liegt bei etwa 4 Wochen.

Die vierschichtige Gliederung der Epidermis findet man überall in der klassischen Felderhaut, die rund 95% der Körperoberfläche ausmacht. Dagegen enthält die Leistenhaut, die man überwiegend in der Handinnenfläche, an den Fingern und an den Fußsohlen findet, eine fünfte Schicht, das Stratum lucidum. Dieses befindet sich zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum und stellt eine Art Übergangszone dar [1].

1.2 Zell-Zell-Kontakte

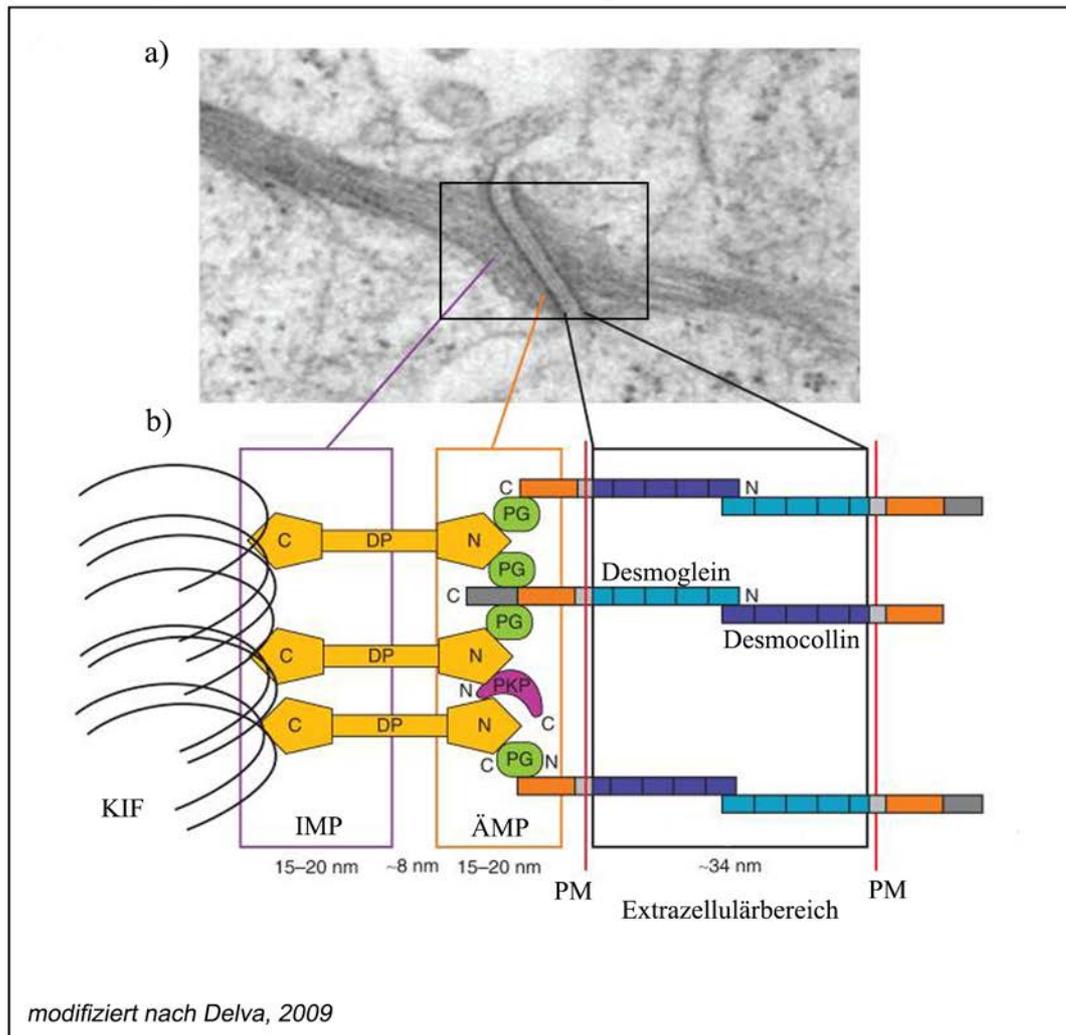
Für den Erhalt eines funktionierenden Gesamtorganismus sind zum einen mechanische Stabilität und Integrität, zum anderen die Barrierefunktion von essentieller Bedeutung.

Diese Faktoren werden durch verschiedene Proteine zwischen den Zellen untereinander bzw. zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix gewährleistet. Somit werden Zell-Zell-Kontakte von Zell-Matrix-Kontakten unterschieden. Zell-Zell-Kontakte werden dabei anhand ihrer Funktion in verschiedene Gruppen unterteilt. So vermitteln Verschlusskontakte, sog. „Tight Junctions“ die Barrierefunktion, während Kommunikationskontakte, z.B. „Gap Junctions“, Zellen funktionell miteinander koppeln können. Des Weiteren gibt es Adhäsionskontakte, welche eine mechanische Verbindung vermitteln. Diese Adhäsionskontakte unterteilen sich in Kontakte, die mit Aktinfilamenten in Verbindung stehen (Zonula adhaerens, Fascia adherens, Punctum adherens) und Adhäsionskontakte, die mit Intermediärfilamenten in Kontakt stehen (Desmosom) [2].

1.3 Desmosom

Desmosomen (Maculae adhaerentes) sind fleckartige interzelluläre Verbindungen, die zur Verknüpfung von Zellen untereinander dienen [3]. Diese Funktion üben sie vor allem in Geweben aus, die fortwährend starker mechanischer Beanspruchung ausgesetzt sind, wie zum Beispiel im mehrschichtig verhornten Plattenepithel der Haut, in den Schleimhäuten des Gastrointestinaltraktes und im Herzmuskel. Erstmals beschrieben wurden sie 1847 vom italienischen Pathologen Bizzozero; den Begriff „Desmosom“ prägte der Wiener Anatom Josef Schaffer, indem er die griechischen Worte für Bindung („desmos“) und Körper („soma“) miteinander verknüpfte. Desmosomen sind meist zwischen 0,2-0,5 µm groß und bestehen aus zwei elektronendichten Plaques, welche durch einen Interzellularspalt von etwa 30 nm voneinander getrennt sind (Abb. 1). Desmosomen bestehen aus Vertretern von 3 Proteinfamilien, den desmosomalen Cadherinen und Vertretern der Armadillo- und der Plakin-Familie [3].

Abbildung 1: Aufbau eines Desmosoms



a) Elektronenmikroskopische Darstellung eines Desmosoms mit einstrahlenden Keratinfilamenten

b) Schemazeichnung der Bestandteile des Desmosoms, (hier jeweils angegeben auch der relative Abstand zur Plasmamembran (PM)):

(ÄMP) = Äußere Membranplaque, (PG) = Plakoglobin, (PKP) = Plakophilin, (DP) = Desmoplakin,

(KIF) = Keratin-Intermediärfilamente, (IMP) = Innere Membranplaque

Die Plaques kann man in eine äußere, elektronendichtere Plaque und eine innere, weniger dichte Plaque, welche direkt mit den Intermediärfilamenten verknüpft ist, unterteilen. Die äußere Plaque enthält unter anderem die desmosomalen Cadherine, welche in Desmocolline (Dsc) und Desmogleine (Dsg) [4] aufgeteilt werden, welche dann im Interzellularspalt mit den entsprechenden Desmocollinen und Desmogleinen der Nachbarzelle interagieren. Ihr zytoplasmatischer Anteil hingegen interagiert mit dem Armadillo-Protein Plakoglobin (Pg), welches als einziges desmosomales Protein

auch in Adhärens-Junktionen zu finden ist. Pg bindet selbst an Desmoplakin (DP), ein Mitglied der Plakin-Familie im Desmosom, welches letztendlich den desmosomalen Plaque mit den sogenannten Intermediärfilamenten verknüpft. Diese Quervernetzung der DP-Moleküle wird von den Plakophilinen (Pkp) (1-3) unterstützt, welche ebenfalls zur Armadillo-Familie gehören [3].

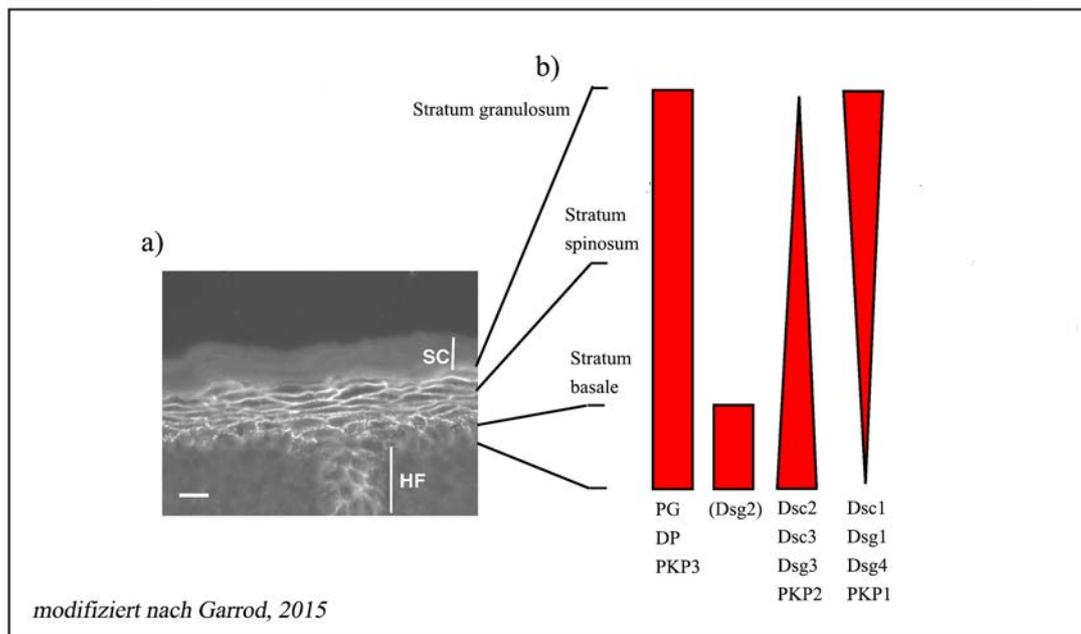
1.3.1 Desmosomale Cadherine

Es gibt mehr als 180 Proteine, die zur Proteinsuperfamilie der Cadherine gezählt werden, wobei man die klassischen Cadherinen, wie z.B. E-Cadherin oder N-Cadherin, von den desmosomalen Cadherinen (Dsc, Dsg), unterscheidet.

Die klassischen Cadherine sind über Catenine intrazellulär mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft, während die desmosomalen Cadherine mit Intermediärfilamenten verknüpft sind. Daher unterscheiden sich der Aufbau der sie beinhaltenden Junktionen, aber auch deren Einbindung in intrazelluläre Signalwege [2].

Bei den desmosomalen Cadherinen handelt es sich um integrale Membranglykoproteine, welche Ca^{2+} -abhängige Zellhaftung vermitteln. Die Familie der Desmocolline besteht aus drei Mitgliedern, (DSC1, 2 und 3), wohingegen von den Desmogleinen vier Unterformen bekannt sind. In einfachen Epithelien sowie im Herzmuskel sind ausschließlich Dsg2 und Dsc2 vorhanden. In mehrschichtig verhorntem Plattenepithel dagegen, der Epidermis, sind die desmosomalen Cadherine schichtenspezifisch verteilt (Abb. 2). Dsg1 findet sich vor allem in den oberflächlichen Schichten. Dsg2 wird entgegen ehemaligen Angaben nicht in der basalen Schicht intakter Epidermis exprimiert, sondern als Bestandteil von Haarfollikeln [5]. Dsg3 wird sowohl basal als auch im Stratum spinosum gebildet [6]. Dsg4 hingegen ist das wichtigste Desmocadherin in Haarfollikeln [7, 8]. Dabei ist zu beachten, dass die desmosomalen Cadherine neben homophilen auch heterophile Bindungen eingehen [9]. Im Speziellen geht Dsc3 sowohl eine heterophile als auch eine homophile Interaktion mit Dsg1 ein, nicht jedoch mit Dsg3. Der Verlust dieser Interaktion könnte eine wichtige Rolle in der Pemphigus-Pathogenese spielen [10].

Abbildung 2: Verteilung desmosomaler Moleküle in der Epidermis



a) Darstellung von Desmosomen der Epidermis in der Maus durch Anfärbung mittels eines Antikörpers gegen Desmoplakin.

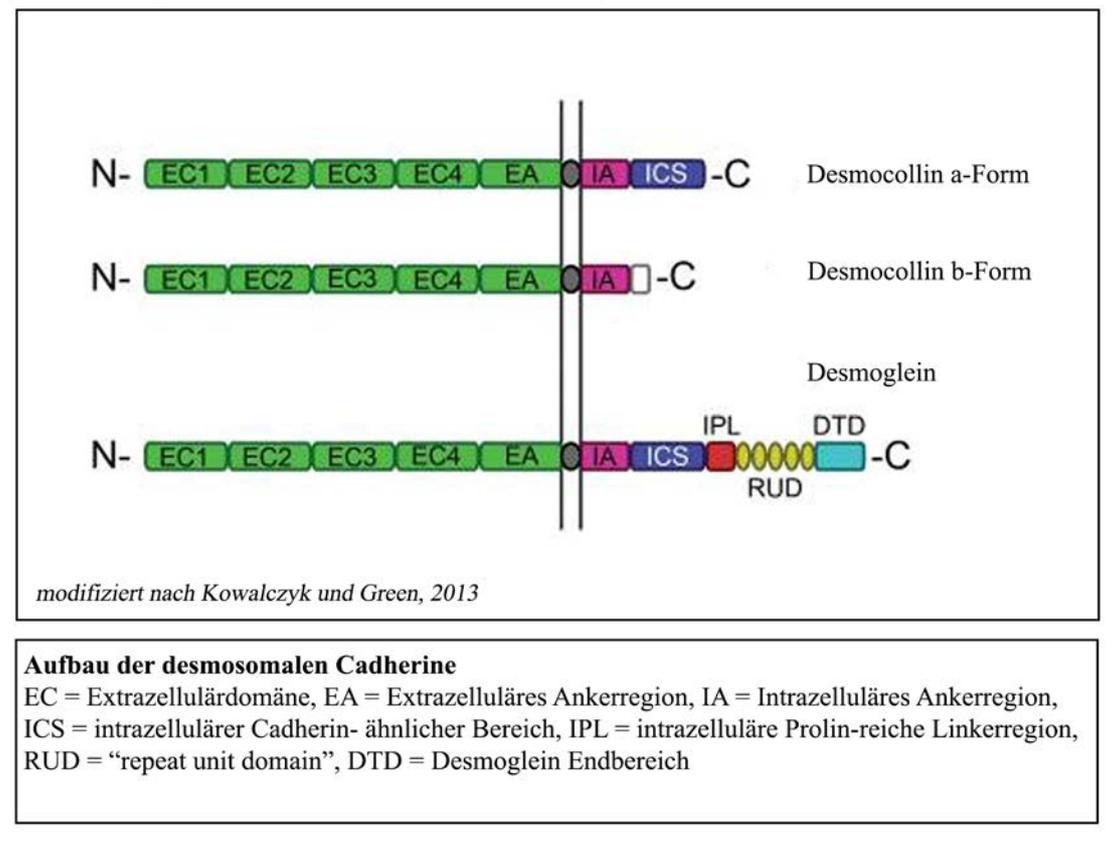
SC = Stratum corneum, HF = Haarfollikel, Maßstab = 25 µm

b) Verteilungsschema der desmosomalen Bestandteile innerhalb der Epidermis

Die Balken symbolisieren die Verteilung der einzelnen Komponenten: PG = Plakoglobin, DP = Desmoplakin, PKP 1-3 = Plakophilin 1-3, Dsc 1-3 = Desmocollin 1-3, Dsg 1-4 = Desmoglein 1-4

Die desmosomalen Cadherine (Desmocollin 1-3, Desmoglein 1-4) (Abb. 3) bestehen aus fünf extrazellulären Cadherin-Bereichen (ECs), die sich wiederholen, einem transmembranären Bereich und einem intrazellulären Bereich, welcher an die desmosomalen Plaqueproteine bindet (EA = Extrazelluläres Ankerregion, IA = Intrazelluläres Ankerregion, ICS = intrazellulärer Cadherin-ähnlicher Bereich, IPL = intrazelluläre Prolin-reiche Linkerregion, RUD = "repeat unit domain", DTD = Desmoglein Endbereich). Durch alternatives Spleißen können alle 3 Desmocolline entweder in einer a- oder einer b-Form vorliegen, welche sich im Falle der b-Form durch eine verkürzte ICS auszeichnen und im Falle von Dsc 1 und 2 mit einer Region aus weiteren 11 Aminosäuren, im Falle der b-Form von Dsc 3 mit einer Region aus weiteren 8 Aminosäuren enden.

Abbildung 3: Desmosomale Cadherine



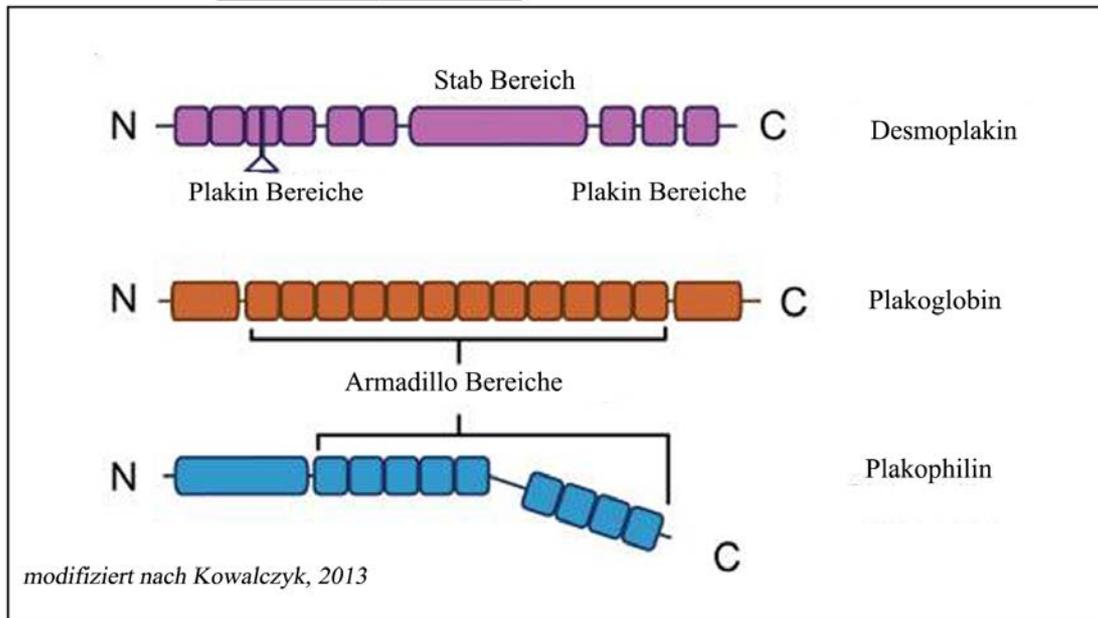
1.3.2 Desmosomale Plaqueproteine

Zu den desmosomalen Plaqueproteinen gehören aus der Familie der Armadillo-Proteine Pg und die Pkps 1-3, sowie DP aus der Familie der Plakine.

1.3.2.1 Armadillo-Proteine

Pg, als das einzige nicht rein desmosomale Plaqueprotein, ist zugleich auch das bestcharakterisierte Armadillo-Protein im Desmosom. Es enthält zwölf Armadillo-Domänen, die beidseitig von bestimmten Amino- und Carboxy-Enddomänen flankiert werden [11-13] (Abb. 4). Des Weiteren lassen die Ergebnisse verschiedener Studien [14] [15] [16] vermuten, dass der Pg-Amino-Terminus und mehrere Arm-Domänen in der Nähe des carboxy-terminalen Endes die Hauptelemente für die Bindung an Cadherine darstellen.

Abbildung 4: Struktureller Aufbau von Desmoplakin und den Armadilloproteinen



Struktureller Aufbau der wichtigsten desmosomalen Plaque-Proteine:
 Desmoplakin ist ein klassisches Protein der Plakinfamilie mit globulären Amino- und Carboxylendbereichen, welche in der Mitte von einer alpha-helikalen verdrehten Stabdomäne zusammengehalten werden.
 Plakoglobin besteht aus zwölf sich wiederholenden Armadillo-Domänen.
 Plakophiline sind ebenso Mitglieder der Armadillo-Proteinfamilie, enthalten jedoch neun Armadillo-Domänen. Die Amino- und Carboxylbereiche variieren je nach Unterform (1-3).

Trotz seiner dualen Rolle sowohl in den Desmosomen als auch in den Adhärenz-Junktionen ist die Bindungsaffinität von Pg zu den desmosomalen Cadherinen höher als die zu E-Cadherin [14]. Es ist außerdem bekannt, dass Pg mit DP interagiert [17].

Die Relevanz von Pg wird durch Deletionsstudien in Mäusen sowie anhand verschiedener Erkrankungen deutlich. Pg-Null-Mäuse sterben zwischen Tag 12-16 der Embryonalperiode aufgrund massiver Herzschiädigung. Interessanterweise fand man aber β -Catenin, ein eng verwandtes Protein zu Pg in den Adhärenz-Junktionen [18] der Mäuse hochreguliert. Daher wird vermutet, dass β -Catenin das Fehlen von Pg nicht kompensieren kann.

Die Desmosomenbildung ist dabei stark beeinträchtigt [19]. Eine weitere Studie beschreibt das Erkranken an der Naxos-Erkrankung als Folge einer bestimmten Mutation in Pg [20], hervorgerufen durch eine Deletion zweier Basen (T und G). Dies führt zu einer Verschiebung des Leserahmens und es kommt zu einem vorzeitigen

Kettenabbruch. Betroffen sind die letzten fünf Aminosäurereste und eine Translation dieses trunkierten Gens führt somit zu einem nicht korrekt funktionierenden Protein [21]. Die betroffenen Patienten zeigen einen typischen Symptomen-Komplex: auffallend wolliges Haar, eine Verhornungsstörung der Haut und arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC).

Neben seiner Funktion als wichtiges Strukturprotein in Zellkontakten agiert Pg als ein zentraler Regulator im TCF-LEF-Weg, zwei Transkriptionsfaktoren, die den Ko-Aktivatoren β -Catenin zu Enhancermolekülen bestimmter Gene rekrutieren, und ist somit ein wichtiger Modulator im Wnt-Signalweg [22]. Dieser Signalweg ist bekannt im Rahmen der Tumorgenese [23], er spielt aber auch eine wichtige Rolle in vielen Entwicklungsprozessen, u.a. in der Haarfollikelbildung [24].

Neben Pg stellen die Pkps eine weitere Untergruppe der Armadilloproteine dar, welche eng mit dem mit klassischen Cadherinen verknüpften p120 verwandt sind und gewebespezifisch exprimiert werden. Sie bestehen aus insgesamt drei Mitgliedern, Pkp 1-3, von denen Pkp1 auch Bestandteil der sogenannten Area Composita [25] in den Glanzstreifen von Kardiomyozyten, die ein Mischkontakt aus Desmosomen und Adhärensjunktion darstellt, ist. Des Weiteren spielt Pkp1 eine wichtige Rolle im Translationsprozess der Proteinbiosynthese, da es direkt mit dem Translationsfaktor eIF4A1 assoziiert ist und durch diesen die Translation reguliert [26]. In den letzten Jahren gewinnt auch die Untergruppe der Pkps zunehmend an Bedeutung, da man unter anderem festgestellt hat, dass Pkp2-Mutationen sehr häufig in Patienten mit ARVC zu finden sind [27].

1.3.2.2 Desmoplakin

DP ist das Protein, welches vorwiegend im Desmosom lokalisiert ist und zur Familie der Plakine zählt. Es kommt in zwei Spleißvarianten vor, DP I und DP II, welche 210 bzw. 250 kDa groß sind [28].

Die wichtigste Funktion von DP ist die Verankerung der Keratinfilamenten am Desmosom [29], mit denen es über seine C-terminale Domäne interagiert. Sein N-terminaler Teil steht zumindest indirekt über Pg mit den desmosomalen Cadherinen in Verbindung. Weiterhin sind Interaktionen mit den Pkps bekannt. Die zentrale

Bedeutung von DP wird ersichtlich, wenn man sich die möglichen Folgen verschiedener Mutationen im DP-Gen ansieht: diese erstrecken sich von der Entstehung einer (oft linksseitigen) ARVC [30], über die zum Teil tödlich verlaufende Hauterkrankung Letale Epidermolysis bullosa [31] bis hin zum Carvajal-Syndrom, einer Naxos-ähnlichen Erkrankung. Auch der Knock-Out von DP im Mausmodell ist nicht lebensfähig. DP-Null Mausembryos zeigen zunächst weniger Desmosomen und sterben am 6. Entwicklungstag aufgrund der fehlenden Ausprägung von extra-embryonalem Gewebe. Bei Re-Expressionsversuchen spezifisch in diesem Gewebe, so dass sich der Embryo weiterentwickeln kann, wurden neben Beeinträchtigung von Herz und Haut auch Defekte im Gefäßsystem und im Neuroepithel festgestellt, was die wichtige Rolle von DP für die Gewebeentwicklung unterstreicht [32].

1.3.3 Zytoskelettverankerung von Desmosomen

Intermediärfilament (IF) durchspannen in Bündeln und Netzwerken das Zytoplasma[33]. Durch ihre Inserierung in den Desmosomen sowie in Hemidesmosomen, spezialisierten Zell-Matrixkontakten, sind sie essentiell für die Stabilität und Integrität von Zellverbänden. Dies wird an der Erkrankung Epidermolysis bullosa simplex deutlich, die mit Blasenbildung in Haut und Schleimhäuten aufgrund von IF-Mutationen einhergeht. IFs dienen auch dem Schutz vor Umweltfaktoren [34] und besitzen eine Schlüsselfunktion in vielen Signalwegen, welche u.a. für Zelldifferenzierung und - wachstum relevant sind [35]. Sie sind im Epithel aus Zytokeratinen (ZK) zusammengesetzt, wobei man in den basalen Schichten der Epidermis vor allem die Zytokeratine 5 und 14, in den suprabasalen ZK 2 und 10 und in den obersten Schichten ZK 1 und 10 [36] findet.

1.3.4 Desmosomale und extradesmosomale Desmoglein-Haftungskontakte

Bis heute gibt es wenige Daten, die die Dynamik zwischen Auf- und Abbau von desmosomalen Proteinen beschreiben. Bekannt ist jedoch, dass der desmosomale Komplex als Ganzer über Stunden stabil ist, was darauf schließen lässt, dass es zwei Gruppen von desmosomalen Cadherinen auf der Zelloberfläche geben muss. Es liegt eine desmosomale und einen extradesmosomalen Gruppe vor. Die extradesmosomale

Gruppe könnte damit einen Speicher für Desmosomen oder einen kurzfristigen Zustand desmosomaler Proteine darstellen, die gerade in die Zelle aufgenommen werden. Des Weiteren wird angenommen, dass extradesmosomale Proteine eine Funktion in der Aktivierung von Signalwegen haben, da z.B. aktive Rho-GTPasen bevorzugt an extradesmosomales Dsg3 binden [37].

1.4 Pemphigus

Die blasenbildende Autoimmundermatose Pemphigus ist unbehandelt eine schwer verlaufende Erkrankung, bei der sich Autoantikörper gegen die desmosomalen Cadherine Dsg1 und Dsg3 [38] ausbilden.

Der Begriff "Pemphigus" stammt vom griechischen Wort "pemphix" ab, was übersetzt "Blase" bedeutet. Durch die Bindung der Antikörper an die desmosomalen Haftproteine verlieren die Keratinozyten untereinander die Haftung und es entstehen intraepidermale Blasen. Die Inzidenz der Erkrankung liegt bei etwa 0,1-0,5 pro 100.000 pro Jahr und ist damit relativ gering. Grundsätzlich tritt Pemphigus in jedem Lebensalter und bei beiden Geschlechtern gleich häufig auf, es ist jedoch ein leichter Altersgipfel bei 40-60 Jahren zu erkennen. Insgesamt ist die Prävalenz in den letzten Jahren gestiegen [39]. Außerdem ist bekannt, dass auch ethnische Aspekte, vor allem in Verbindung mit HLA-Klasse-II-Allelen, eine wichtige Rolle bei der Krankheitsentwicklung einnehmen. So ist z.B. aufgefallen, dass bestimmte ethnische Gruppen wie z.B. die Ashkenazi-Juden oder generell Menschen aus Mittelmeerländern eine Prädisposition aufweisen [40].

1.4.1 Klinik

Klinisch werden 2 verschiedene Typen unterschieden: Pemphigus vulgaris (PV), welcher sich durch suprabasale intraepidermale Blasenbildung der Haut sowie Schleimhauterosionen auszeichnet, und Pemphigus foliaceus [41] welcher in erster Linie mit intraepidermaler Spaltbildung in den oberen Schichten der Epidermis, im Stratum granulosum einhergeht. Diese Unterteilung hängt mit dem Vorkommen unterschiedlicher Antikörper zusammen: Im Falle von PV sind nur Antikörper gegen

Dsg 1 zu finden. Beim schleimhautdominanten PV-Typ treten vorwiegend Antikörper nur gegen Dsg3 auf. Wenn dagegen auch die Epidermis betroffen ist finden sich auch Antikörper gegen Dsg1. Neben diesen bekannten Autoantikörpern wurden mittlerweile ebenfalls pathogene Antikörper gegen Dsc3 nachgewiesen [42], [43]. Des Weiteren sind ebenfalls einige sogenannte „nicht-desmosomalen“ Antikörper zu erwähnen. Hier sind als Beispiele Antikörper gegen Acetylcholinrezeptoren zu nennen, hier im Speziellen gegen den $\alpha 9$ AChR [44], sowie gegen Thyroperoxidase (TPO) [45]. Ebenso wurde vorgeschlagen, dass auch Antikörper gegen mitochondriale Proteine eine pathogene Rolle spielen, indem durch ihr Binden an diese Moleküle der intrinsische Apoptoseweg eingeleitet wird [46]. Die Relevanz dieser nicht desmosomalen Antikörper ist insgesamt aber nicht klar.

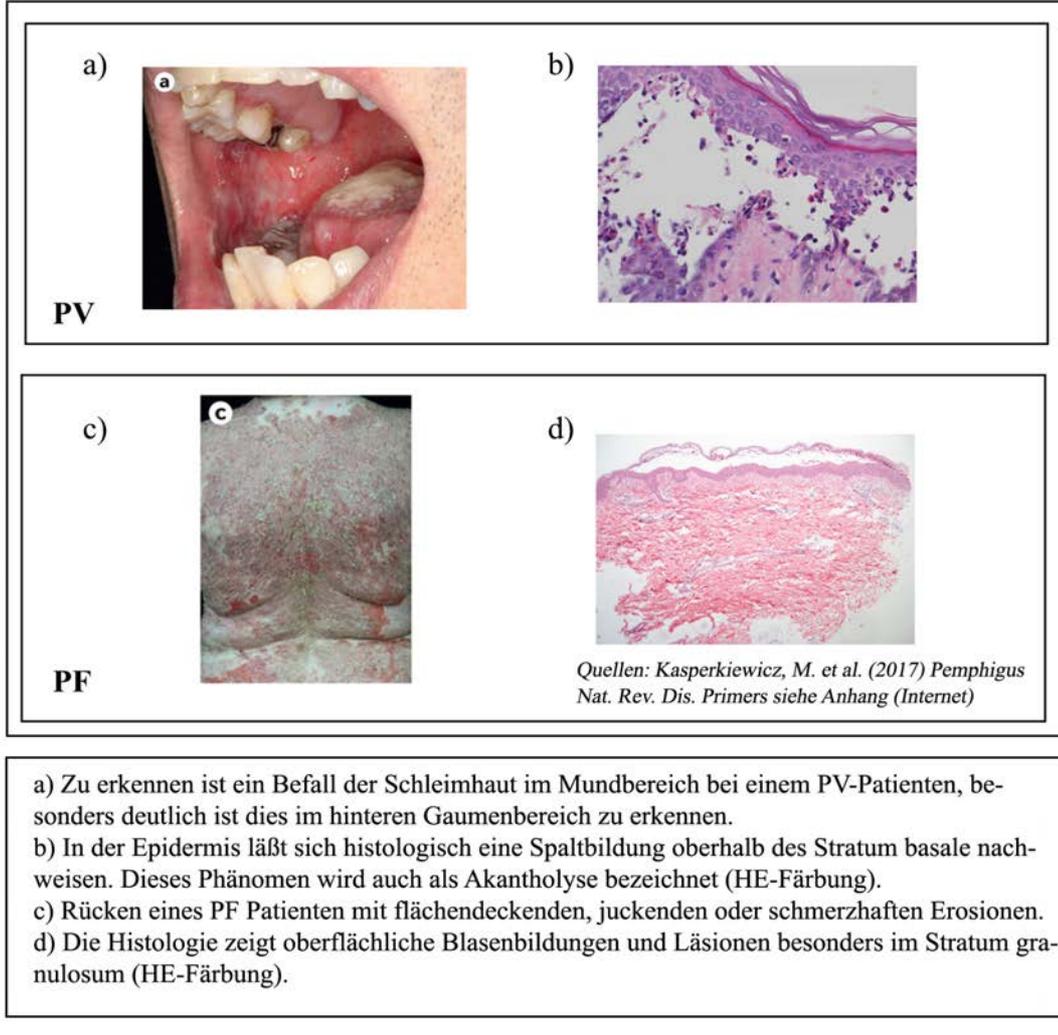
Im Falle von PV beginnen die Symptome üblicherweise in der Mundschleimhaut (Abb. 5). Es finden sich hierbei weniger Blasen, sondern eher schmerzhafte Läsionen. Besonders betroffen ist die hintere Wangenschleimhaut durch Einwirkung starker Scherkräfte, aber auch Zunge, Gaumen und sogar Nase oder Rachen etc. können betroffen sein [47]. Dieser Schleimhaut-dominante Typ wird vom meist im späteren Verlauf auftretenden mukokutanen Typ unterschieden. Es entstehen schlaffe, leicht rupturierende Blasen und Abscherungen [48]. Diese finden sich besonders am Körperstamm, in der Achsel und in der Leistenregion. Grundsätzlich kann jedoch die Epidermis am ganzen Körper betroffen sein. PF hingegen verläuft milder und fällt primär durch kaum heilende Krusten und Erosionen im Bereich des Kopfes und des Rumpfes auf, die Schleimhäute sind bei dieser Form nicht betroffen. Durch die oberflächliche Lage der Spaltbildung sind die Blasen sehr fragil und deshalb selten sichtbar. Eine endemische Form des PF, der sogenannte „Fogo Selvagem“ gilt als Variante, welche in erster Linie in Südamerika (im Speziellen Brasilien) auftritt und sich durch ein sehr polymorphes Bild aus gleichzeitig bullösen, verucciformen, pustulösen und erythrodermischen Hautveränderungen auszeichnet [49]. Neben diesen beiden Hauptformen gibt es noch den mit Tumoren assoziierten paraneoplastischen Pemphigus, welcher sich durch ausgeprägte Erosionen, insbesondere im Mundbereich, charakterisiert und als sehr therapieresistent gilt [50]. Als eher seltene Ausprägung des Pemphigus gilt der Pemphigus erythematosus, welcher sich als eine Kombination aus Pemphigus foliaceus und Lupus erythematosus darstellt. Hierbei finden sich die

klassischen Hautfluoreszenzen neben den klassischen Serummarkern beider Erkrankungen gleichzeitig.

Die Diagnose der Erkrankung erfolgt zumeist mit einigen standardisierten Verfahren: Nach dem Stellen der Verdachtsdiagnose PV bzw. PF dienen Untersuchungsbefunde wie das sogenannte „Nikolski-Zeichen“ der weiteren Differentialdiagnostik: bei Nikolski I wird ein Schiebedruck auf die gesunde Haut ausgeübt, wodurch daraufhin Blasenbildung induziert wird. Im Falle von einem positiven Nikolski II wird durch seitlichen Druck das Weiterschieben von Blasen ermöglicht. Diese Zeichen sind klassischerweise positive Zeichen im Falle von PV und PF, sie sind jedoch nicht spezifisch für die Pemphigus-Erkrankung [51]. Als weiterer Schritt sollte eine direkte Immunfluoreszenz durchgeführt werden, welche sich als Goldstandard der Pemphigus-Diagnostik etabliert hat. Hierbei finden sich im Falle von PV suprabasale, im Falle von PF in der oberen Epidermis eingelagerte IgG-Antikörper an den Zellgrenzen der Keratinozyten. Die Biopsie hierfür wird in der Regel periläsional durchgeführt [50]. Außerdem erfolgt eine indirekte Immunfluoreszenz auf Affenösophagus, da dieser durch seine starke Expression von Dsg3 als das sensitivste Substrat gilt. Inzwischen hat sich der ELISA zur Sicherung des Vorhandenseins von Autoantikörpern gegen Dsg1 und Dsg3 etabliert.

Aktuell existieren verschiedene validierte klinische Verfahren um eine möglichst objektive Klassifizierung der Schwere der Erkrankung zu gewährleisten, von denen hier drei exemplarisch dargestellt seien: der sogenannte „ABSIS“ (Autoimmune Bullouse Skin Disorder Intensity Score), welcher im Speziellen für eine Einschätzung der Wirksamkeit einer Glukokortikoidbehandlung eingesetzt wird und neben klinischer Aktivität und Außmaß der Erkrankung auch subjektive Konsequenzen der Schleimhautveränderungen des Patienten misst. Des Weiteren gibt es den sogenannten „PDAI“ (Pemphigus Disease Area Index) welcher jeweils eine Punktzahl pro anatomische Region basierend auf Anzahl und Größe der Läsionen verteilt. Ein dritter, jedoch selten genutzter Parameter, der sogenannte „PVAS“ (Pemphigus Vulgaris Activity Score) beurteilt Aktivität auf Haut und Schleimhaut anhand einer Punktzahl von 0 bis 18 [52].

Abbildung 5: Klinik und Histologie von PV- und PF-Patienten



Derzeit gibt es keine kausale Therapie des Pemphigus. Daher wird vor allem mit immunsuppressiven Ansätzen gearbeitet. Zunächst werden hochdosiert Glukokortikoide eingesetzt, die im Verlauf mit weiteren Immunsuppressiva kombiniert werden um ihre Dosis senken zu können und so Nebenwirkungen zu reduzieren.

Als selektivere Behandlungsmethode wird mittlerweile auch der humanisierte monoklonale CD20-Antikörper Rituximab verwendet, welcher in erster Linie auf die autoreaktiven B-Zellen abzielt. Bei dieser Behandlungsmethode konnten in zahlreichen Studien deutliche Verbesserungen ermittelt werden, insbesondere in sehr aggressiven Verläufen [53], [54]. Als zwei weitere anerkannte Behandlungsmöglichkeiten gelten die Plasmapherese, also der Austausch des Blutplasmas des Patienten, sowie der Einsatz

von intravenösen Immunglobulinen. Des Weiteren ist neben diesen Behandlungsansätzen eine symptomatische Therapie, die eine adäquate Schmerztherapie und Wundversorgung sowie die psychische Betreuung der Patienten beinhalten sollte, für den Behandlungserfolg von entscheidender Bedeutung. Letztendlich sollte das Finden spezifischer Therapien für die Pemphigus-Erkrankung weiterhin als ein wichtiges Ziel der Forschung angesehen werden [55].

1.4.2 Pathogenese

Es bestehen zwei Hypothesen zu den Mechanismen, wie es zur epidermalen Spaltbildung durch Autoantikörper in Pemphigus kommt. Das erste Modell beruht auf der Grundlage, dass Antikörper an die extrazelluläre Domäne der Desmogleine binden, wodurch die Zellhaftung direkt gestört wird. Dieser Mechanismus wird als sogenannte „sterische Behinderung“ bezeichnet und wird durch Daten verschiedener Studien unterstützt. Tsunoda et al. [56] zeigte, dass diese pathogenen Autoantikörper an funktionell wichtige Regionen von Dsg3 binden. Weitere Studien mittels Atomkraftmikroskopie konnten später zeigen, dass PV-IgG die Dsg3-Bindung direkt beeinträchtigen und somit zum Haftungsverlust beitragen. Eine direkte Hemmung der Dsg1-Bindung durch PV-IgG oder PF-IgG wurde dagegen nicht beobachtet [57, 58]. Gegen diese Theorie spricht jedoch, dass die alleinige Bindung von Autoantikörpern an die Zelloberfläche für eine Zelldissoziation nicht suffizient ist [59].

In Zusammenhang mit der direkten Behinderung der Dsg-Bindungs-Theorie ist die Desmoglein-Kompensations-Theorie vorgeschlagen worden [60], welche auf der differentiellen schichtabhängigen Expression der Desmogleine in der Epidermis beruht und die unterschiedliche Spaltbildung bei PV und PF erklären soll. Diese Theorie schlägt vor, dass sich Dsg1 und Dsg3 gegenseitig kompensieren können und dass durch schichtspezifisch abhängige Desmogleine Spaltbildungen in verschiedener Höhe der Epidermis entstehen. Dieses ist wiederum von den vorhandenen Antikörpern abhängig [61].

Diese Theorie besagt konkret, dass in den tieferen Epidermis-Schichten beide Cadherine, also sowohl Dsg1 als auch Dsg3 zu finden sind. Hier könnte Dsg3 dann den Verlust von Dsg1 kompensieren, welcher durch Dsg1-spezifische Autoantikörper

herbeigeführt worden ist. Dies würde dann zu einer oberflächlichen Spaltbildung führen, da sich in den oberen Schichten der Epidermis vor allem Dsg1 aber kein Dsg3 befindet, was am ehesten mit dem Bild eines PF-Patienten einhergehen würde.

Beim PV hingegen würde es zu keiner epidermalen Blasenbildung kommen, solange nur Antikörper gegen Dsg3 vorhanden sind, da Dsg1 den Dsg3-Autoantikörper-induzierten Verlust von Dsg3 kompensieren könnte. In den Schleimhäuten, in denen fast ausschließlich Dsg3 exprimiert wird, kommt es dagegen zur Akantholyse. Im Falle der Autoantikörper gegen Dsg3 und Dsg1 kommt es zu zusätzlicher oberflächlicher Blasenbildung sowie Ulzerationen in den Schleimhäuten.

Dennoch bleiben einige Punkte unklar und diese Theorie kann die Pathogenese auch nur teilweise erklären. Unklar bleibt z.B., warum es im Falle von PV zu keinem kompletten Haftungsverlust über alle Schichten der Epidermis hinwegkommt, obwohl hier zumeist Antikörper sowohl gegen Dsg1 als auch Dsg3 gefunden werden.

Die zweite Theorie beruht auf dem Einfluss verschiedener Signalkaskaden, welche durch Bindung von PV-IgGs an Desmogleine innerhalb und außerhalb des Desmosoms getriggert verändert werden. Diese Signalwege führen in der Folge zum Kollaps des Zytoskeletts (Keratinfilament-Retraktion) bis hin zur Zerstörung des Desmosoms [62].

Ein zentrales Molekül dieser Signalwege stellt die p38MAPK dar. Hierfür ist gezeigt worden, dass PV-IgG zur Aktivierung dieser Kinase führt, was über Phosphorylierung von HSP27 zum Zellhaftungsverlust beiträgt. Dies wurde in verschiedenen Modellen untersucht, die Blockade dieses Signalwegs verhinderte beispielsweise die Blasenbildung in einem PV-Mausmodell [63]. Auch Verwendung von Hautmodellen von PV-Patienten [64], sowie eines PF-Mausmodells [63] zeigte, dass p38MAPK-Aktivierung eine wichtige Rolle spielt. Der genaue Mechanismus ist noch unklar, es wurde aber gezeigt, dass ein Komplex aus p38MAPK, Pg und Dsg3 existiert und die Zugabe von Dsg3-Autoantikörpern zu einer vermehrten Phosphorylierung der p38MAPK in diesem Komplex führt [65]. Des Weiteren kommt es durch p38MAPK-Aktivierung zu einer Störung der Keratinfilamentverankerung. Hierbei kommt es zur Verlagerung der Intermediärfilamente um den Zellkern herum, was als Keratinfilament-Retraktion bezeichnet wird. Dieser wichtige Pathomechanismus wurde anhand von Phosphorylierungsstudien und Immunfluoreszenzen unter

Verwendung von einer Keratinozytenzelllinie nachgewiesen, jedoch auch mittels in-vivo-Modellen und unter direkter Verwendung von Patientenhaut [65, 66].

Doch nicht nur die p38MAPK sondern auch die im Signalweg darauffolgende Kinase, die sogenannte MAPKAP2 (MK2) [67], scheint bei diesem Mechanismus involviert zu sein, da sie in Zellen aus Pemphigus-Läsionen humaner Proben in aktiviertem Zustand vorlag und ihre Hemmung in-vivo eine protektive Wirkung, wenn auch nur auf spontane Blasenbildung, hatte [68].

Ebenso wird vermutet, dass der Transkriptionsfaktor c-myc bei der Pemphigus Pathogenese wichtig ist, da er durch das Plaqueprotein Pg reguliert wird, wobei Pg physiologischerweise das Proto-Onkogen c-myc supprimiert. Indirekte Depletion von Pg durch PV-IgG führt dadurch zu Aufhebung dieser Suppression und somit zu verstärkter Zellproliferation und zur Schwächung der interzellulären Adhäsion [69]. Auch für die Proteinkinase C (PKC) sind Daten veröffentlicht, die zeigen, dass deren Aktivierung auch über verschiedene Zwischenschritte auf die Blasenbildung einwirken kann. Es ist gezeigt worden, dass PV-IgG zur Aktivierung der Phospholipase C (PLP-C) führt, was in der Produktion von IP3 resultiert und somit einen deutlichen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels zur Folge hat [70]. Diese Ereignisse führen letztendlich zur Aktivierung der PKC. Für die Hemmung sowohl von PLP-C als auch PKC wurde eine verminderte Blasenbildung in-vivo gezeigt [71, 72], was somit vielversprechende Therapieansatzmöglichkeiten bieten könnte.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Aktivierung verschiedener Signalwege durch Bindung von Autoantikörpern an desmosomale Cadherine zum Haftungsverlust führt und dass man mittels Manipulation dieser intrazellulären Signalwege, z.B. durch das Einsetzen spezifischer Inhibitoren die die Blasenbildung in Pemphigus vermindern könnte.

1.5 p38MAPK

Die Stresskinase p38MAPK gilt als Teil der wichtigsten in die Pemphigus-Pathogenese involvierten Signalkaskade. Da sie für diese Arbeit von zentraler Bedeutung ist, soll sie hier kurz beschrieben werden. Sie wurde als 38 kDa großes Protein isoliert, welches durch Lipopolysaccharid (LPS) schnell Tyrosin-phosphoryliert wird. Insgesamt sind

vier Spleißvarianten bekannt, p38 α - δ , welche gewebsspezifisch exprimiert werden [73]. In einem in-vivo-Modell konnte ihre Aktivierung nachgewiesen werden indem gezeigt wurde, dass sich als Folge einer Behandlung mit Pemphigus-Patientenserum und pharmakologischer Hemmung dieser Kinase sich die Blasenbildung im Mausmodell deutlich reduzierte [74]. Grundsätzlich gehört die p38MAPK zur Familie der MAPK, was für "mitogen-aktivierte Proteinkinasen" steht. Die MAPKs sind essentiell für die Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Beweglichkeit und dem Überleben der Zelle [75]. Die p38MAPK werden von einer Vielzahl von unterschiedlichen Umweltfaktoren und inflammatorischen Zytokinen aktiviert, wobei die Stresssignale durch kleine GTPasen aus der Rho-Familie (Rac, Rho, Cdc42) zu ihrer Aktivierung führen [76]. Umgekehrt kann p38MAPK aber auch die Aktivität von RhoA regulieren [77].

1.6 Fragestellung

Pemphigus vulgaris ist eine schwer verlaufende Autoimmunerkrankung der Haut und der Schleimhäute, bei der Autoantikörper gegen Haftmoleküle vom Cadherin-Typ (Dsg1 und 3) gebildet werden. Dadurch kommt es zu einem interzellulären Haftungsverlust. An diese desmosomalen Cadherine, welche selbst extrazellulär an Cadherine der Nachbarzelle geknüpft sind, binden intrazelluläre Plaqueproteine wie z.B. Pg und DP, die für die Verankerung an die Intermediärfilamente essentiell sind. Somit wird im Regelfall die Stabilität der Zell-Zell-Haftung gewährleistet. Diese ist von immenser Bedeutung für den menschlichen und tierischen Organismus. Daher unterliegen die Desmosomen einer strengen Regulation, sowohl was die Menge und Verteilung ihrer Komponenten, als auch was die Mechanismen ihrer Interaktion untereinander bzw. mit ihren angrenzenden Strukturelementen, wie z.B. dem Zytoskelett angeht. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Plaqueproteine Pg und DP in Hinblick auf ihre Bedeutung für die Keratinozytenhaftung untersucht werden. Daneben soll geklärt werden, ob und wie diese Proteine im p38MAPK-Signalweg eine Rolle spielen und für die Wirkung von Pemphigus-Autoantikörpern notwendig sind.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Es wurden folgende drei Zelllinien in Kultur gehalten: Die HaCaT- (human adult low calcium elevated temperature) Zelllinie ist eine immortalisierte Keratinozytenzelllinie, die als spontan transformiert eingestuft wird, jedoch nicht tumorigen ist [78]. Sie behält weitergehend Differenzierungsfähigkeit normaler Keratinozyten.

Für die Produktion der lentiviralen Überstände für die shRNA-vermittelte Proteindepletion wurden HEK293-Zellen verwendet, eine embryonale Nierenzelllinie, welche als besonders anspruchslos und leicht transfizierbar gilt.

Um die Effekte der Desmoplakin-Mutante DP-S2849G-GFP auf die Zelladhäsion zu untersuchen wurden u.a. A431-Zellen verwendet, welche von Prof. Kathleen Green (PhD, Northwestern University, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden waren und über ein Doxycyclin-vermitteltes Tet-On-System die besagte Mutante integriert haben. Für die Induktion der Mutante wurden 4 µg/ml eingesetzt (nach Durchführung einer Titrationsreihe), welches zu einer stabilen Expression nach 24-48h führte. Diese Zelllinie ist eine humane Zelllinie aus einem Epidermoid-Karzinom.

Alle drei Zelllinien wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM, Life Technologies, Darmstadt) mit einer Konzentration von 1,8 mmol/L Ca² sowie 4,5 g/L Glucose unter Zusatz von 50 U/ml Penicillin G und 50 µg Streptomycin sowie 10% fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom, Berlin) gehalten. Das Medium wurde mindestens jeden zweiten Tag bzw. nach Bedarf auch öfter gewechselt.

Die Zellen wurden in Brutschränken mit einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Temperatur von 37°C bis zum Erreichen eines konfluenten Stadiums gehalten. Das Passagieren der Zellen erfolgte nach einem kurzen Waschvorgang mit sterilem PBS im Falle der HEK293- und A431-Zellen bzw. nach einem 20-minütigen Chelations-Schritt von Ca²⁺ (zur Schwächung der Cadherin-Bindung) mittels PBS-EDTA-Lösung (0,05% EDTA in PBS) im Falle der HaCaT-Linie durch Zugabe von Trypsinlösung (0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA in PBS) um die Zellen vom Boden der Kulturflasche abzulösen. Anschließend erfolgte ein gründliches Resuspendieren der Zellen und eine entsprechende Aussaat. Je nach Versuchsbedingung wurde in 24-Well-Platten

mit/ohne Deckgläschen oder in T75-Flaschen zur weiteren Haltung oder für Immunpräzipitationsversuche ausgesät.

2.2 Antikörper und Testreagenzien

Die Detektion bestimmter Proteine im Western Blot bzw. in der Immunfärbung basiert auf der Erkennung spezifischer Epitope, der Zielproteine mittels spezifischer Antikörper - der "Primärantikörper", welche dann durch Fluorophor- oder Peroxidasegekoppelte "Sekundärantikörper", gerichtet gegen den Fc-Teil der Primärantikörper, sichtbar gemacht werden können. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in den Tabellen 1 und 2 zu finden.

Tabelle 1:

Antikörper	Typ	Hersteller	Verwendung in der IF	Verwendung im Western Blot
anti-Plakoglobin (Klon PG 5.1)	Monoklonal	Progen	1:100	1:1000
anti-Desmoplakin IP	Polyklonal	Santa Cruz	n.v.	1:1000
anti-Desmoplakin IF	Polyklonal	K. Green	1:100	n.v.
anti- β -Actin (Klon AC-74)	Monoklonal	Sigma Aldrich	n.v.	1:1000
anti-phospho-p38MAPK	Polyklonal	Cell signaling	n.v.	1:1000
anti-p38MAPK	Polyklonal	Cell signaling	n.v.	1:1000
anti-GAPDH (GAPDH-71.1)	Monoklonal	Sigma-Aldrich	n.v.	1:1000
anti-Dsg3	Polyklonal	Santa Cruz	n.v.	1:1000
anti-Dsg3 (Klon 5G11)	Monoklonal	Thermo-Fisher	1:100	n.v.
anti-GFP (Klon B-2)	Monoklonal	Santa Cruz	n.v.	1:1000

n.v. = nicht verwendet

Tabelle 2:

Antikörper	gekoppelt mit	Hersteller	Konzentration
Ziege-anti-Maus	Cy2 & Cy3	Dianova	1:600
Ziege-anti-Kaninchen (garb)	Cy2 & Cy3	Dianova	1:600
Ziege-anti-Maus	Pox (HRP-gekoppelt)	Dianova	1:3000
Ziege-anti-Kaninchen (garb)	Pox (HRP-gekoppelt)	Dianova	1:3000
Ziege-anti-Kaninchen (garb)	Pox (HRP-gekoppelt)	Cell Signaling	1:1000
Ziege-anti-Maus	Cy5	Dianova	1:200

2.2.1 Farbstoff-gekoppelte Antikörper

Zur Darstellung der Zytokeratin-Filamente in den HaCaT-Zellen wurden zwei Antikörper gegen diese ZK-Filamente verwendet. Diese tragen ihr Fluorophor schon an sich gekoppelt und benötigen daher keinen Zweitantikörper. Die Darstellung von Aktin wird durch an Phalloidin gekoppeltes Alexa 488 gewährleistet, welches spezifisch an F-Aktin bindet. Dieses wurde in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt.

Tabelle 3:

Antikörper	Kombiniert mit	Hersteller	Konzentration
Anti-Pan-Cytokeratin (Klon 11)	FITC	Sigma-Aldrich	1:100
Anti-Pan-Cytokeratin	eFluor 570	Ebioscience	1:100

2.2.2 Mediatoren

Die in Tabelle 4 aufgelisteten Mediatoren wurden zur Modulation verschiedener bei PV wichtiger Signalwege eingesetzt.

Tabelle 4:

Name	Hersteller	Funktion	Konzentration
SB202190	Calbiochem	p38MAPK-Inhibitor	20 μ M
TP	Bachem GmbH	Peptid zur Stabilisierung der Dsg-Bindung	20 μ M
Bim-X	Enzo Life Science	PKC-inhibitor	1 μ M

2.2.3 Aufreinigung von pathogenen Anti-Dsg3- und Patientenantikörpern

Der monoklonale anti-Dsg3-Antikörper AK23 wurde mittels einer stabilen Zelllinie (aus einem murinen PV-Mausmodell stammend) selbst hergestellt, indem die AK23-Hybridomazellen zunächst auf eine entsprechende Zellzahl hochgezüchtet wurden und anschließend wurden die Zellüberstände geerntet und dann über eine Protein-G-Agarose-Säule aufgereinigt wurden. Anschließend wurde die Konzentration der jeweiligen Aufreinigung mittels Proteinbestimmungs-Assay (bicinchoninic acid assay, BCA-Assay) bestimmt. In den folgenden Versuchen wurde dieser monoklonale Antikörper in der Konzentration 75 μ g/ml eingesetzt.

Für die Versuche mit Seren von Pemphiguspatienten wurden Proben von Patienten verwendet, deren Erkrankung zuvor klinisch, histologisch und serologisch gesichert wurde. Diese Proben wurden dann im Einverständnis der Patienten von Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Schmidt (Universitätsklinikum Lübeck) zur Verfügung gestellt. Als Kontrollen dienten Seren von gesunden Freiwilligen. Zur Aufreinigung der IgG-Fractionen diente die sogenannte Affinitätschromatographie. Hierbei wurde Protein A Agarose (Calbiochem; Nottingham) verwendet, aus welcher das Protein mittels Citratpuffer (25 mM, pH 2.4) eluiert wurde. Anschließend wurde dieses Eluat aus gereinigtem Antikörpergemisch der IgG-Fractionen von Patientenserum bzw.

Kontrollpersonen über Nacht gegen 5 l PBS dialysiert. Anschließend wurden die IgG-Fraktionen dann jeweils mittels ELISA auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen Dsg 1 und 3 getestet und dann entsprechend in der Konzentration 0,5 mg/ml eingesetzt.

2.2.4 Verwendete DNA-Konstrukte

Tabelle 6:

Name	Funktion / Zweck	Woher
DP-GFP	Wildtyp	Kathleen Green (Northwestern University, Chicago, IL, USA)
DP-S2849G- GFP	Punktmutante an Serin 2849 Zeigte verstärkte Zellhaftung	Kathleen Green (Northwestern University, Chicago, IL, USA)
GFP-Plakoglobin (Pg-WT)	Expression von wildtypischem Pg-GFP (nuklär & membranär)	Stefan Hübner (Universität Würzburg)
GFP-Plakoglobin-NLS (Pg-NLS)	Expression von nukleär lokalisiertem Pg-GFP	Stefan Hübner (Universität Würzburg)
GFP-Plakoglobin-NES (Pg-NES)	Expression von extranukleär lokalisiertem Pg-GFP	Stefan Hübner (Universität Würzburg)
GFP-Leervektor	Expression von GFP	

2.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Charakterisierung der Expression und Verteilung spezifischer Proteine in der Zelle unter verschiedenen Bedingungen wird die IF genutzt. Wie bereits beschrieben, werden dabei Primärantikörper gegen das Zielmolekül verwendet sowie Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper.

Hierfür wurden HaCaT-Zellen in einer Verdünnung von 1:2 auf runde Deckgläschen (Ø 12 mm) ausgesät und dann je nach Versuch am nächsten Tag transfiziert oder bis zur Konfluenz in DMEM-Medium gehalten und anschließend mit dem entsprechenden

Mediator und Antikörpern je nach Versuchsbedingung behandelt. Als nächstes wurden die Zellen auf den Deckgläschen mit 2% PFA (Paraformaldehyd) 10 min fixiert und anschließend nach dreimaligem Waschen mit PBS für 5 min mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen für 30 min mit 25 µl BSA-NGS (0,1% Rinderserumalbumin mit 10% Ziegen Serum in PBS) inkubiert, um unspezifische Antikörperbindestellen zu blocken. Diese Lösung wurde dann vorsichtig mit einem Tuch entfernt, worauf Übernacht-Inkubation mit einem primären Antikörper (25 µl) in einer feuchten Kammer bei 4°C erfolgte. Am nächsten Tag folgte eine 1 h Inkubation des passenden Sekundärantikörpers nach vorherigem Waschen mit PBS. Nach dieser Inkubation folgten weitere Waschschrte bis anschließend die Deckgläschen mit dem Zellrasen nach unten auf die Objektträger fixiert wurden, wofür NPG (1% n-Propylgallat mit 60% Glycerin in PBS) verwendet wurde, dieses verhindert ein zu schnelles Ausbleichen der Fluoreszenz. Für die Messung der Keratinfilamentretraktion wurde wie folgt vorgegangen: Es wurde die Distanz vom Zellkern zum peripheren Ende der Hauptstruktur des Keratinnetzwerkes gemessen und von derselben Stelle ebenso die Distanz vom Zellkern zur Zellmembran (erkennbar durch das restliche Dsg3 und das Ende einzelner noch vorhandener Keratinfilamente). Das Verhältnis dieser zwei Abstände wurde dann berechnet und zur Beschreibung von Keratinfilamentretraktion verwendet.

2.4 Proteinbestimmung durch Western-Blot-Analyse

2.4.1 Lysatherstellung

Um Effekte auf die Proteinmenge durch Inkubation mit Mediatoren und den Pemphigus-Antikörpern, detektieren und quantifizieren zu können, ist es notwendig, die Proteine aus den Zellen zu extrahieren. Hierfür wurden die Zellen nach der Inkubation kurz mit PBS gewaschen und dann anschließend mit Probenpuffer (SDS-Lysepuffer (25 mmol HEPES, 2 mmol EDTA, 25 mmol NaF, 1% SDS) + Proteaseinhibitoren (Mix in Tablettenform, 1:1, Roche) versetzt. Nun wurde die Probe mit der Pipettenspitze oder im Falle größerer Flächen mit dem Zellschaber abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine kurze Behandlung mit

Ultraschall, um das Lysat zu homogenisieren. Die Proben wurden bei -20°C gelagert oder sofort die Proteinmenge gemessen (siehe 2.5.2).

2.4.2 Proteinbestimmung nach Pierce

Für Immunpräzipitationen und SDS-Polyacrylamidelektrophorese-Versuche wurden die Proben mit dem BCA Protein Assay Kit von Thermo Fisher gemessen. Die vorher unbekannte Proteinkonzentration einer Probe wurde mittels einer vordefinierten Konzentrationsreihe eines Proteins mit bekannter Konzentration (hier bovines Albumin) bestimmt. Wichtig war hierbei die Standardkurve unter Verwendung desselben Diluenten zu bestimmen. Zur Messung verwendete man ein Gemisch aus Standardlösung A und B (beide im Kit enthalten), die eine entsprechende Farbreaktion auslösen und dann anschließend anhand einer photometrischen Absorptionsmessung mit dem Plattenphotometer (Tecan) ausgewertet wurde.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blotting

Diese Methode diente der Auftrennung eines Proteingemisches anhand ihres Molekulargewichts. Um hierbei die unterschiedlichen Ladungen der Proteine als weiteren Faktor auszuschließen und die Proteine zur Entfaltung zu bringen, wurde Sodiumdodecylsulfat (SDS) hinzugegeben, ein anionisches Tensid, welches durch Bindung an die Proteine das Vorliegen einheitlicher Ladungen bewirkt. Außerdem wurden die Proben mit Lämmli-Puffer versetzt und auf 95°C erhitzt, um den Denaturierungsprozess zusätzlich zu unterstützen, damit die Proteine anschließend je nach Masse schneller oder langsamer durch das elektrische Feld zur Anode gelangen.

Zur Auftrennung der Proteingemische wurde die Probe nach Ultraschallbehandlung im Verhältnis 1:1 mit Lämmli-Puffer versetzt. Anschließend wurden die Proben auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, in welchem sie zunächst gesammelt (Sammelgel, 5% Polyacrylamidgel) und dann in einem 7,5% Gel der Größe nach aufgetrennt wurden. Wichtige Bestandteile für die Polymerisation waren hier Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED). Die Gele wurden in vertikale Elektrophorese-Systeme (Biorad) gespannt und die Elektrophorese fand bei 80 V (Sammelgel) bzw. 120 V (Trenngel) statt. Parallel zu den Proben, für die alle entsprechend die gleiche

Proteinmenge aufgetragen wurde, lief ein Größenmarker (PPL oder HRPL, Fermentas) mit, um später die Proteine anhand ihrer Größe analysieren zu können.

Im nächsten Schritt wurden die Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond, Amersham) übertragen. Der Transfer lief mittels elektrischer Spannung, die an eine Transfer-Kammer über zwei Graphitelektroden angelegt wurde. In die Kammer wurden mit Blot-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol) durchtränkte Filterpapiere (Whatman-Paper) und dazwischen die Nitrocellulosemembran positioniert. Für den Transfer wurde eine Stromstärke von 350 mA für 1,5 h angelegt.

2.4.4 Proteindetektion

Zur Detektion der gewünschten Proteine wurden Primärantikörpern gegen die Epitope der Zielproteine und Sekundärantikörper zur Erkennung der Fc-Fragmente der Primärantikörper verwendet. Vor der Inkubation wurden die Nitrocellulosemembranen in 5% Magermilch in tris-buffered saline (TBS-Tween) (0,1%) für 1 h zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungen geblockt. Anschließend wurde der jeweilige Primärantikörper hinzugegeben und über Nacht bei 4°C im Kühlrotor inkubiert. Dann folgte dreimaliges Waschen in TBS-Tween (0,1%) und eine 2 h Inkubation des Sekundärantikörpers, ein Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Antikörper, bei Raumtemperatur. Danach wurde erneut dreimal gewaschen bevor die endgültige Proteindetektion mittels der ECL („enhanced chemiluminescence“)-Methode möglich war.

Hierbei katalysiert die Meerrettich-Peroxidase die Reaktion von Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid zu einer Carbonylverbindung, welche ihrerseits Licht emittieren kann. Die ECL-Lösung I (Luminol) und II (H₂O₂) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran wurde 1 min in kompletter Dunkelheit inkubiert. Zur Detektion des emittierten Lichts wurde das FluorchemE-Gerät der Firma Biozym verwendet.

2.5 Triton-X-100-vermittelte Proteinextraktion

Durch die Proteinextraktion mit einem Triton-X-100-enthaltenden Puffer erhält man die Möglichkeit, einen zytoskelettalen Anteil von einem nicht-zytoskelettalen Anteil getrennt zu untersuchen. Hierfür wurden HaCat-Zellen bzw. A431-Zellen entsprechend ihrer Bedingungen (also Behandlung mit bestimmten Mediatoren, Transfektion mit DNA-Konstrukten) bis zur Konfluenz gehalten und dann kurz mit eiskaltem PBS gewaschen, bevor sie für 5 min auf Eis mit Extraktionspuffer (0,5% Triton-X-100, 50 mmol/l MES, 25 mmol/l EGTA, 5 mmol/l MgCl₂, pH 6,8) auf einem Schüttler inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen im Tritonpuffer abgekratzt und in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt. Diesem Schritt folgt eine 5-minütige Zentrifugation bei 4° und 8000 xg. Der tritonhaltige Überstand (welcher die nicht-zytoskelettal-gebundene Fraktion darstellt) wurde dann in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, während das zurückbleibende Pellet (der zytoskelettale Anteil) in einem Gemisch aus SDS-Lysepuffer und Proteaseinhibitor (1:1) aufgenommen und resuspendiert wurde. Anschließend wurden die Proben mit Ultraschall behandelt und ihr Proteingehalt mittels BCA-Kit analysiert, um diese dann für Western-Blot-Analysen zu verwenden. Wichtig hierbei war die Proteinbestimmung mit dem jeweilig passenden Standard (je nach Puffer).

2.6 Zelldissoziationsversuche

Mittels des etablierten Dispase-basierten Dissoziations-Versuchs wurde in Keratinozyten die Zell-Zell-Adhäsion quantifiziert.

Hierfür wurden die Keratinozyten in 24-Well-Platten ausgesät und bis zur Konfluenz (100% Wachstumsdichte der Monolayer) gehalten, z.T. vorher transfiziert oder 1 h bzw. 24 h mit AK23 oder PV-IgG behandelt. Anschließend wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen und dann für 30 min bei 37° mit 150 µl Dispase-II (2,4 U/ml, Sigma-Aldrich) inkubiert, welche dafür sorgt, dass sich der Zellrasen vom Boden der Kulturschale ablöst. Anschließend wurden je 200 µl HBSS zugegeben um die Reaktion der Dispase zu verdünnen. Nun wurde der Zellrasen mit einer elektrischen Pipette zehnmal auf- und abpipettiert. Die hierdurch entstandenen Fragmente wurden dann mit einem Binokular-Mikroskop gezählt (Maßgabe: alle Wells mit der gleichen Vergrößerung) und dienten als Maß für den Haftungsverlust (\cong 40 mm Okular).

2.7 „Proximity-Ligation“-Versuch

Mit dieser Methode kann man sehr enge räumliche Nähe zwischen zwei Proteinen detektieren, allerdings kann keine direkte Interaktion nachgewiesen werden.

Dennoch bietet diese Methode weitere Vorteile: mittels eines Konfokalmikroskops war es hier möglich, die Lokalisation der engen Beziehung beider Proteine zu detektieren. Die Stelle enger räumlicher Lokalisation wurde als fluoreszierendes Signal dargestellt.

Hierfür wurden Zellen wie für eine normale Immunfärbung einschließlich Inkubation der Erstantikörper behandelt. Beide Antikörper mussten hierbei aus unterschiedlichen Spezies kommen, z.B. aus Kaninchen und Maus. Die Proben wurden über Nacht wie üblich bei 4°C in einer Feuchtkammer gelagert. Am nächsten Tag fand nach einem Waschschrift die Inkubation mit den spezifischen PLA-Probe-Zweitantikörpern statt. Diese sind den üblichen Zweitantikörpern sehr ähnlich, jedoch mit Oligonukleotiden statt Fluorophoren gekoppelt. Wenn sich beide Proteine und somit Sekundärantikörper in enger räumlicher Nähe befanden, konnten komplementäre Nukleotidketten ligiert werden. Dieses Stück wurde dann von einer DNA-Polymerase amplifiziert, schließlich wird die DNA über interkalierende fluoreszierende Stoffe markiert, die dann unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar wurden. Als passende Kontrollen verwendete man nur jeweils einen Primärantikörper, es sollten möglichst keine Signale auftreten.

Die Proben wurden in einem Eindeckmedium eingedeckelt, welches 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) zur Quantifizierung der Zellkerne enthielt. Zusätzlich wurde in den Proben auch noch F-Aktin gefärbt.

2.8 Immunpräzipitation

Mit der Immunpräzipitation ist es möglich, mittels Antikörper ein Antigen aus einer Lösung zu konzentrieren und Protein-Protein-Wechselwirkungen damit nachzuweisen, da das jeweilige Protein immer mitsamt seinen gesamten Interaktionspartnern aus einem Lysat präzipitiert wird.

Zunächst wurden die Zelllysate aus einer konfluenten T75-Flasche HaCat-Zellen hergestellt. Die Zellen werden kurz mit kaltem PBS gewaschen, bevor sie mit 800 µl 2X-

Ripa-Puffer (0,1 M Tris-HCl 0,3 M NaCl, 2% SDS, 1% NP-40, 0,0001 M EDTA, pH 8,0) und Proteaseinhibitoren (Roche, Complete Ultra) im Verhältnis 1:1 auf Eis für 30 min inkubiert wurden. Wichtig war hierbei ein Aliquot für die spätere Input-Kontrolle, ein pures Lysat aufzusparen (40-50 µl der puren Probe vor jeglicher Verdünnung).

Anschließend wurde das Lysat in ein Eppendorf überführt und für 5 min bei 4°C und 14000 xg zentrifugiert und Überstand und Pellet dann separiert. Es folgte eine Proteinbestimmung des Überstands, um dann die Lysate auf eine Gesamtproteinmenge von 600-1000 µg einzustellen.

Diese Proben wurden mit der entsprechenden Agarose, welche zuvor dreimal mit dem IP-Puffer gewaschen wurden, (je nach Protein-Verwendung von Protein A/G-Agarose (Santa Cruz) oder True Blot-Anti-Rabbit Agarose (Ebioscience) für 1 h bei 4°C im Kühlrotor vorgereinigt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde dann das vorgeklärte Lysat mit dem entsprechenden Antikörper bzw. als Kontrolle ohne Antikörper für weitere 3 h im Kühlrotor inkubiert. Anschließend wurde das Lysat-Antikörper-Gemisch auf 40 µl frisch gewaschene Agarose gegeben und über Nacht im Kühlrotor bei 4°C inkubiert.

Danach wurden die Proben für 5 min bei 8000 xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde dann mit je 22 µl Lämmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Zum Schluss folgte ein letzter Zentrifugationsschritt für 5 min bei Raumtemperatur auf 13000 g und 20µl des Lämmli-Überstandes wurde in ein frisches Eppendorf überführt. Hiervon wurden dann 18 µl pro Probe und entsprechend jeweils ein pures Lysat auf ein 7,5% haltiges Polyacrylamid-Gel aufgetragen um sie dann mittels Immunoblot-Verfahren nachzuweisen.

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Transfektion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für einige Versuche die Zelllinien transient mit DNA-Plasmiden bzw. siRNA transfiziert.

2.9.1.1 Transfektion mit DNA-Konstrukten

Um HaCat-Zellen mit Plasmiden zu transfizieren wurde Turbofect (Fermentas) verwendet. Dies ist ein Lipidreagenz mit kationischen Polymeren, welches zusammen mit der DNA Komplexe bildet und somit die DNA gleichzeitig vor Degradation schützt und in die Zellen einbringt. Hierfür werden Zellen am Tag vor der Transfektion in einer Verdünnung von 1:4 in eine 24-Well-Platte ausgesät. Bei 70-80% Konfluenz wird dann ein Mediumswechsel durchgeführt und der vorgemischte Ansatz auf die Zellen gegeben (100 µl DMEM ohne Zusätze, entsprechende DNA-Menge (falls nicht anders angegeben 1 µg), 1,5 µl Turbofect je Well - Inkubation für 40 min). Ein weiterer Mediumswechsel wird 8 h nach Transfektion durchgeführt.

Für die Transfektion von sehr großen DP-Plasmiden wurde Lipofectamine LTX & PLUS (Invitrogen) benutzt, jeweils 1,5 µl aus beiden Reagenzien. Hiermit kann auch für dieses Konstrukt eine ausreichend hohe Expression erzielt werden. Alternativ wurde Lipofectamine 3000 für weitere Versuche hergenommen, als dieses neu auf den Markt kam und gleiche Effizienz leistete. Hierbei waren ebenfalls je 1,5 µl pro Reagenz notwendig. Versuche wurden dann jeweils 48-72 h nach Transfektion durchgeführt.

2.9.1.2 Transfektion mit siRNA (small interfering RNA)

Das Einbringen kurzer RNA-Fragmente (siRNA) ermöglicht eine verringerte Proteinexpression und ermöglicht so das Studieren der Auswirkungen bei kurzfristigem Verlust eines bestimmten Proteins. Die siRNAs wurden entweder direkt bei Dharmacon gekauft oder von Eurofins hergestellt, nach vorherigem Eigendesign. Die Lagerung erfolgte bei -80°C bis zur Verwendung. Die Transfektion selbst fand analog der obengenannten Transfektion statt: pro Well wurden 3 µl (0,78 µg/µl) siRNA und 1,5 µl Turbofect verwendet. Der Ansatz wurde 24 h mit den Zellen inkubiert, dann fand ein Mediumswechsel statt. Versuche mit den transfizierten Zellen fanden in der Regel 48-72 h nach Transfektion statt.

2.9.2 Transformation von Konstrukten in E. coli-Bakterien

Um ein Plasmid vervielfältigen zu können, ist es nötig diese DNA in kompetente Bakterienzellen zu transformieren. Hier wurde eine Mischung aus den beiden

klassischen Methoden verwendet: eine Kombination aus chemischer und elektrischer Transformation.

Hierfür verwendete man 1-2 μl DNA des jeweiligen Konstrukts, dann fügte man 20 μl KCM-Puffer (5-fach, 500 mM KCl, 150 mM CaCl_2 , 250 mM MgCl_2) dazu und füllte auf 100 μl Gesamtvolumen mit sterilem H_2O auf. Anschließend mischte man dieses mit weiteren 100 μl kompetenten DH5- α Bakterienzellen, durch vorsichtiges Auf-und-Ab-Pipettieren. Dieser Ansatz wurde dann für 30 min auf Eis gestellt. Anschließend folgte ein Hitze-Schock bei 42°C für 5 min und eine nochmalige 5 min Inkubation auf Eis bevor 900 μl Luria-Broth-Medium (LB-Medium) ohne Antibiotikum dazugegeben wurden. Nun wurde das Gemisch bei 37°C in einen Heizblock gestellt und für 1 h dort rotiert. Nach der Stunde auf dem Schüttler wurde der Ansatz bei 6000 xg für 3 min zentrifugiert und der Überstand (ca. 1 ml) entfernt, so dass das nun sichtbare Bakterienpellet in nun etwa übrigen 100 μl LB-Medium resuspendiert und auf eine Agarplatte mit der entsprechenden Antibiotika-Resistenz des Plasmids gestrichen werden konnte. Nach 16-24 h waren dann eine Vielzahl an Kolonien, welche das entsprechende Plasmid trugen, bereits makroskopisch zu erkennen. Die effektive Aufnahme des Plasmids durch die kompetenten Bakterien musste nach Aufreinigung der DNA im Rahmen einer Kontrolldigestion untersucht werden.

2.9.3 Präparation von DNA-Konstrukten

Vor der Transfektion von Zellen mit DNA-Plasmiden ist es notwendig, diese DNA effizient und möglichst sauber aufzureinigen. Hierfür gibt es verschiedene Methoden, die sich insbesondere im Reinheitsgrad der DNA und somit in ihrer Qualität unterscheiden. Für den direkten Kontakt mit Zellen ist es empfehlenswert DNA so aufzureinigen, dass diese nicht endotoxinbelastet ist. Hierfür wurde das Midi-Prep-Kit von Macherey-Nagel verwendet. Für eine solche Midi-Prep benötigte man mindestens 100ml Bakterienkultur, welche man vorher mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum im Bakterien-schüttler für etwa 8 h bei 37°C heranzüchten musste. Dann wurde diese Kultur bei 4°C etwa 10 min bei 8000 xg zentrifugiert und anschließend wie im Protokoll angegeben mit Lysepuffer lysiert. Anschließend folgte eine Neutralisation und das Gemisch wurde über eine vorher vorgespülte Säule gegeben um darin die DNA aufzufangen. Es folgten mehrere Waschschrte, bevor die

DNA in vorgewärmtem Eluations-Puffer aus dem Säulenboden herausgelöst werden und mit Isopropanol gefällt werden konnte. Nun folgte eine 30 min Zentrifugation bei 4°C und 8000 g. Nach weiteren Waschschrinen, dieses Mal mit Ethanol, wurde das DNA-Pellet in TE-Puffer gelöst und mittels des Plattenlesegeräts gemessen um den DNA-Gehalt zu bestimmen. Idealerweise lag die 260/280-Ratio der DNA bei 1.8. Die gelöste DNA wurde dann bei -20°C gelagert.

2.10 Etablierung eines lentiviralen shRNA-Systems

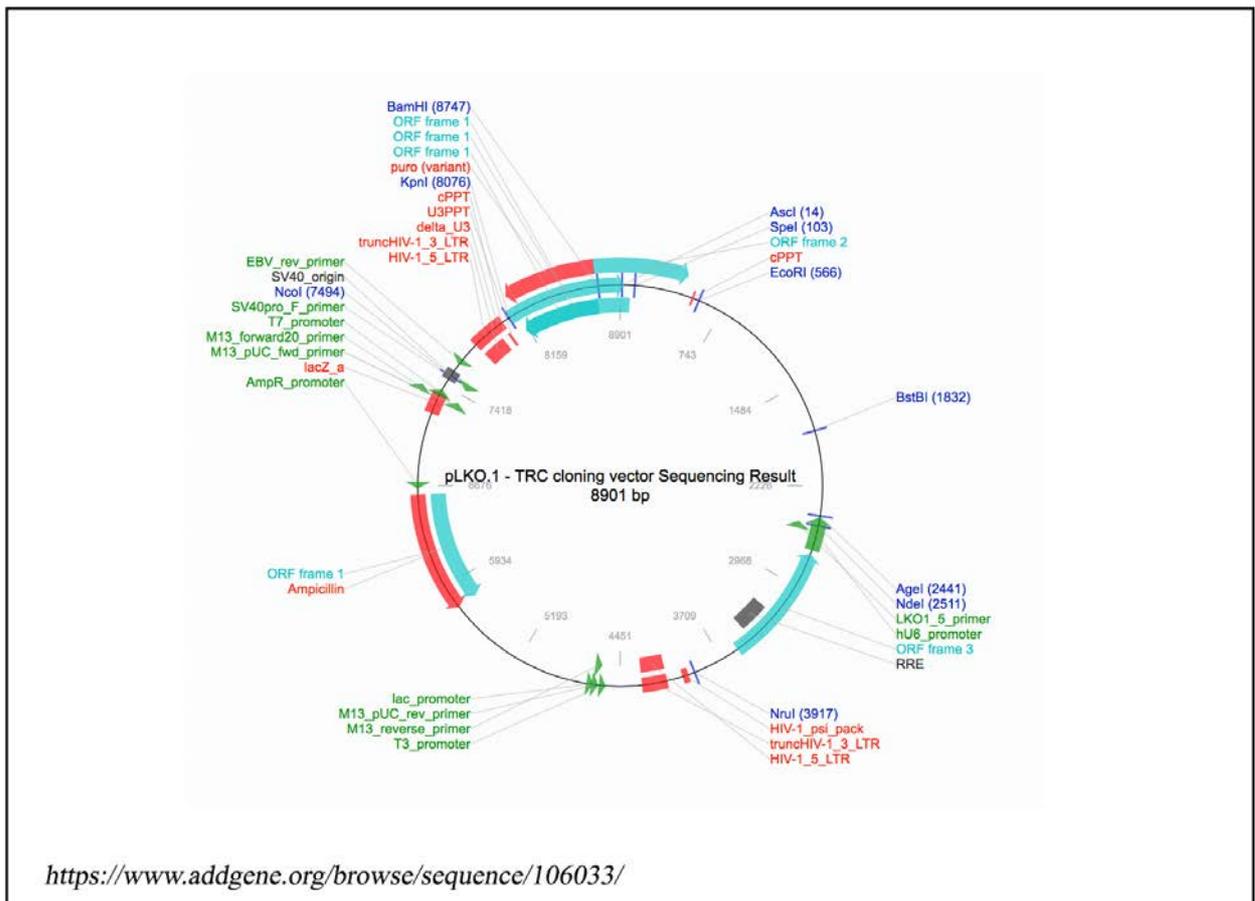
2.10.1 shRNA-Design

Für die Suche einer geeigneten shRNA-Sequenz für die Plakoglobin-mRNA, benutzten wir die Website des "The RNAi Consortiums" (415 Main Street Cambridge, MA 0214). Hierbei handelt es sich um eine Datenbank, die es ermöglicht, anhand der entsprechenden Genidentifikationsnummer (zu finden auf: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) eine geeignete Zielsequenz für das Gen des gewünschten Proteins zu finden. Dort findet man ebenfalls hilfreiche Punkte wie ein empfohlenes Vektorsystem, Daten zur Übereinstimmungswahrscheinlichkeit etc.

2.10.2 Auswahl des Vektor-Systems

Als Basis für den shRNA-vermittelten Knock-Down wurde das PLKO1-System gewählt. Hierfür wurde der PLKO1-Vektor sowie der dazugehörige PLKO1-Kontrollvektor bei der Firma Addgene bestellt.

Abbildung 6: Vektorkarte pLKO.1 Cloning Vector



Vektorkarte des shRNA-Basisvektors pLKO.1 TRC

Diese Vektorkarte zeigt alle wichtigen Informationen für den korrekten Klonierungsprozess des Zielvektors. Unter anderem sind hier das Resistenzgen zu Ampicillin, eine Vielzahl an wichtigen Promotorregionen und einige wichtige Restriktionsstellen zu erkennen. Weitere Informationen können unter Anwendung von Klonierungsprogrammen wie "nebcutter" herausgefunden und angewendet werden.

2.10.3 Präparation der DNA

Nach Transformation und Amplifikation mittels kompetenter XL1-Blue-*E.coli*-Bakterien und anschließender Präparation wurde der PLKO1-Vektor mit den Enzymen

EcoRI und AgeI verdaut um die Platzhaltesequenz („Stuffer“) von 1900 bp herauszuschneiden. Der Verdau fand bei 37°C für eine Stunde statt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf einem 1%igen Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt und anschließend mit UV-Licht bestrahlt, um die Banden detektieren zu können und die Bande, die das Vektor-Rückgrat repräsentiert, markiert und anschließend mittels eines Skalpels herausschneiden zu können. Übrig bleibt dann der linearisierte Vektor aus genau 7001 bp.

Restriktionsansatz

6 µg PLKO1-Vektor-DNA

2 µl Puffer 0

2 µl EcoRI

2 µl AgeI

auf 20 µl mit *DEPC-Wasser auffüllen.

* DEPC steht für Diethylpyrocarbonat und dient der Inaktivierung von RNAsen.

Mithilfe des DNA-Isolations-Sets von Qiagen wurden die ausgeschnittenen DNA-Stücke dann aus dem Agarosegel herausgelöst und aufgereinigt. Anstelle des Platzhalters („Stuffer“), welcher sich zwischen den Restriktionsstellen der Restriktionsendonukleasen EcoRI (p566) und AgeI (p2441) befindet, ist nun Platz für die gewünschte Zielsequenz. Der Kontrollvektor musste lediglich mittels einer Bakterienkultur vermehrt und die entsprechende DNA aufgereinigt werden. Er trägt eine („non-target“) nichtkodierende Sequenz von etwa 18 bp in sich.

2.10.4 Anlagerungsprozess

Parallel zur Digestion des Vektors wurde der Ansatz für die Anlagerung, d.h. die Verknüpfung der Oligonukleotid-Stränge, angesetzt:

5 µl Oligo vorwärts (zuvor gelöst in einer Konzentration von 1 µg/µl)

5 µl Oligo rückwärts (zuvor gelöst in einer Konzentration von 1 µg/µl)

5 µl Annealing Buffer (10X 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 M NaCl, 10 mM EDTA)

35 µl DEPC-Wasser

Dieser Ansatz wurde dann in die PCR-Maschine gestellt und die Oligonukleotid-Stränge wurden mithilfe eines vorher geschriebenen Anlagerungsprotokoll hybridisiert.

2.10.5 Ligation

In diesem Schritt wurde die shRNA-Sequenz in den linearisierten Vektor ligiert, hierfür eignete sich besonders die T4-Ligase.

Ligationsansatz:

2 µl verknüpfte Oligos "aneinandergelagert"

20 ng linearisierter pLKO1-Klonierungsvektor

2 µl T4 Ligase-Buffer

1 µl T4 DNA-Ligase

auf 20µl Gesamtvolumen mit DEPC-Wasser auffüllen.

Dieser Ansatz wurde nun über Nacht (oder wahlweise 4 h) bei 16°C inkubiert.

Anschließend wurden 2 µl dieses Ansatzes genommen und kompetente XL1-Blue-Cell-*E. coli*-Bakterien wurden damit transformiert. Als Resistenzantibiotikum wurde hierbei Ampicillin verwendet.

2.10.6 Zellklon-Isolierung

Am Tag nach der Transformation wurden nun einzelne Kolonien von der Platte abgenommen, in einzelne 3 ml LB-Medium Kulturen überführt und für 8 h im Bakterienschüttler herangezüchtet. Anschließend isolierte man aus den einzelnen Klonen die DNA mittels des 1-2-3 Verfahrens (Puffer 1: 600 ml H₂O, 25 µl 1M Tris-HCl pH 8, 20 µl 0.5M EDTA pH 8, 150 g Saccharose pro 1l, Puffer 2: 930 ml H₂O, 20 ml 10 N NaOH, 50 ml 20% SDS, Puffer 3: 3 M Kaliumacetatlösung pH 5). Zur Verifizierung passender Klone (pLKO1-Vektor mit entsprechend eingebauter Sequenz) wurde eine Kontrolldigestion durchgeführt. Hierfür wurde das Restriktionsenzym PvuI verwendet, welches drei Schnittstellen von jeweils gut detektierbarer Größe besitzt, nämlich auf Höhe von 4000-, 2000- und 1000 bp-Fragmente erzeugt. Natürlich ist diese Methode nur äußerst ungenau und eine Sequenzierung (durchgeführt bei Eurofins) war

unabdingbar. Um unnötige Versuche und Kosten mit eventuell nicht effizienten Klonen zu sparen, wurden nun die HaCaT-Zellen testweise mit der gewonnenen DNA transient transfiziert und dann unter den passenden Vektoren der jeweils effizienteste ausgewählt. Dieser wurde für die spätere Virusproduktion verwendet.

2.10.7 Virusproduktion

Für die Produktion der viralen Überstände verwendeten wir ein Lentivirus-System der 2. Generation. HEK293-Zellen wurden 1:5 - 1:10 in einer 35 mm Petrischale (Sarstedt) am Tag vor der Transfektion ausgesät. Am folgenden Tag gegen Abend wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt und folgender Ansatz zugegeben:

15 µg Vektor (pLKO1 + entsprechende Sequenz), auf 1 µg/µl verdünnt

11,5 µg δ 8.9 (Verpackungsproteine für das Virus)

3,75 µg VSV-G (Hüllprotein für das Virus)

500 µl CaCl₂ (0,25 M)

500 µl BBS

Am nächsten Morgen fand ein Mediumswechsel statt und es wurden 10 ml frisches Medium vorsichtig auf die HEK293-Zellen gegeben. Weitere 24 h später konnte der 1. Virusüberstand geerntet werden, einen Tag später der 2. Virusüberstand.

Diese Überstände wurden dann gemischt und bei -80°C aliquotiert. Alternativ kann man sie auch im Kühlschrank lagern und dann zur Transduktion verwenden.

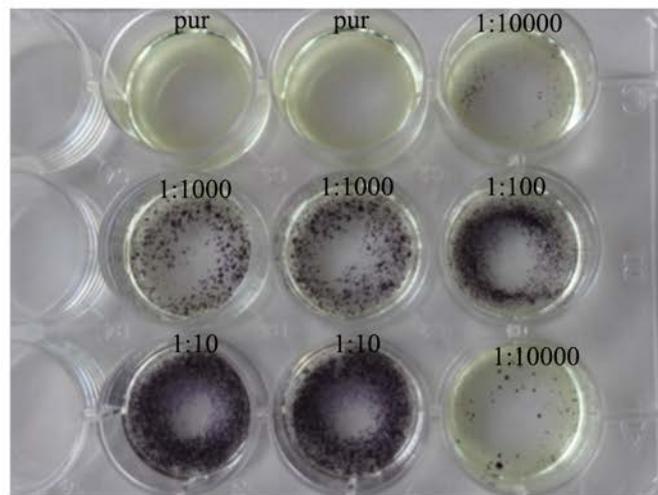
2.10.8 Transduktion

Hiermit wird das Infizieren der Zielzellen mit dem Virus bezeichnet, was somit die Integration der shRNA in das Genom der Zielzellen, in unserem Fall der HaCaT-Zellen zur Folge hat. Hierfür werden diese am Tag vor der Transduktion im Verhältnis 1:2 ausgesät und bis zu einer Dichte von etwa 70-80% konfluent gehalten. Vor Zugabe der Viruspartikel musste ein Mediumswechsel erfolgen, welchem 10 µg/µl Polybrene (Hexadimethrin-Bromid, Sigma) hinzugegeben wurden, welches dazu dient, die Effizienz der Transduktion zu erhöhen. Anschließend konnte der Überstand direkt oder nach Aufkonzentrierung mittels Ultrazentrifugation hinzugegeben werden. Nach 24 h

sollte ein Mediumswechsel erfolgen und dann konnte anschließend mit entsprechendem Selektionsdruck (Puromycin) eine stabile Zelllinie etabliert werden.

2.10.9 MOI-Bestimmung

Abbildung 7: MOI-Bestimmung



Fotographische Bildaufnahme: Titerbestimmung des shPg-Lentivirus

Die Titerbestimmung des Virusüberstandes erfolgt anhand der klassischen Methode mittels Kristallviolett-Färbung (MTT). Anschließend erfolgt die Zählung der (hier Puromycin)-resistenter Kolonien in der HT29-Tumorzelllinie.

MOI-Berechnung = # Viruspartikel pro Zielzelle; entsprechend der verwendeten # cfu/ml Virusüberstandes, 1 Kolonie = 1 cfu x Verünnungsfaktor

Die Bestimmung des viralen Titers (# cfu/ml) in Zellkulturüberständen von Verpackungszelllinien ist aus folgenden Gründen notwendig: zur Überprüfung der viralen Überstände auf die Infektionsfunktion, zur Bestimmung der optimalen Infektionsbedingungen bzw. der multiplicity of infection (MOI = # Viruspartikel pro Zielzelle; dieses entspricht der verwendeten # cfu/ml Virusstammlösung in die Infektion), zur Bestimmung der maximalen Anzahl an Zielzellen, die durch ein vorgegebenes Virusvolumen infiziert werden kann. Hierfür wurden die Zellen unterschiedlichen Konzentrationen von Puromycin (0,5–5 µg/ml), ausgesetzt. Die

optimale Konzentration eines Antibiotikums ist dann erreicht, wenn nach 10-14 Tagen nahezu alle Zellen tot sind (Protokoll Invitrogen). Im Falle von den HT29-Zellen und auch den HaCaT-Zellen lag diese bei 1 µg/ml. Zur Virustiterbestimmung: HT29-Zellen wurden in einer 12 Well-Platte ausgesät, so dass die Zellen am Tag der Transduktion etwa 30-50% Konfluenz erreichen. Die Zellen wurden dann in einem vorher festgelegtem Schema, hier durch Verdünnen der Konzentration in 1:10 Schritten, mit dem vorher frisch produzierten Virus wie oben beschrieben transduziert. Am nächsten Tag fand dann ein Mediumswechsel mit vollständigem Kulturmedium statt und erst ab Tag 4 begann die Zugabe des Antibiotikums Puromycin (1 µg/ml). Nach 14 Tagen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) zur Darstellung lebender Zellen gefärbt (Abb. 7). Falls der lentivirale Titer nicht ausreichend hoch ist, kann eine Ultrazentrifugation der lentiviralen Überstände erfolgen. Hierfür wurden die Virus-enthaltenden Überstände bei 20000 xg in einem SW-28 Rotor für 4 h rotiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100-150 µl PBS resuspendiert und bis zur Verwendung bei -80°C weggefroren.

2.11 Bildaufnahme und Bildbearbeitung

Die Immunfärbungen wurden an einem Konfokalmikroskop (Leica SP5) aufgenommen. Dabei wird ein 63X Öl-Objektiv mit numerischer Aperatur (Leica) verwendet. Die Bildbearbeitung erfolgte dann anschließend überwiegend mit dem Programm Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems). Diese wurde ebenso für alle Abbildungen und Schemazeichnungen genutzt. Die Auswertung von Western Blots erfolgte anhand des frei im Internet erhältlichen Programms „ImageJ“.

2.12 Statistik

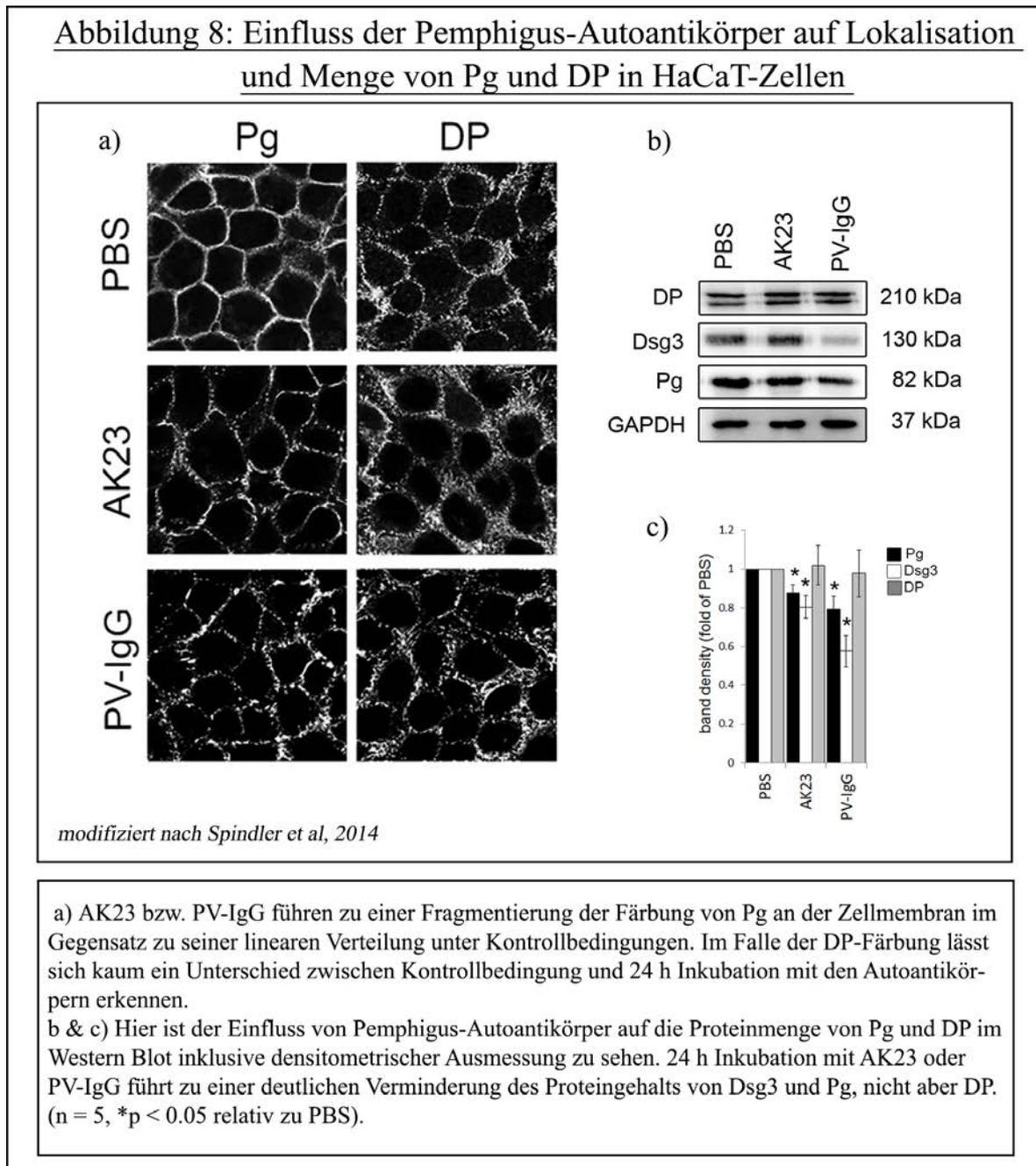
Säulendiagramme wurden mit Hilfe von Excel (Microsoft) dargestellt. Angegebene Fehlerbalken repräsentieren jeweils die Werte für den Standardfehler (SEM). Der P-Wert zur Darstellung statistischer Signifikanz (p) wird entweder mit zweiseitigem Student-T-Test in Excel (bei zwei zu vergleichenden Stichproben) oder mittels ANOVA (GraphPad Prism) bei mehr als 2 Stichproben berechnet. Anschließend erfolgte eine

Bonferroni-Korrektur (mehrere Gruppen relativ zu einer Kontrollgruppe). Der signifikante p-Wert wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Pemphigus-Autoantikörper führen zur Reduktion des Pg-Spiegels

Um die Bedeutung der desmosomalen Proteine Plakoglobin (Pg) und Desmoplakin (DP) für die Pathogenese von PV herauszufinden, wurde in einem ersten Schritt die Auswirkung von Pemphigusautoantikörpern auf Proteinmenge und Proteinlokalisierung in HaCaT-Zellen untersucht.



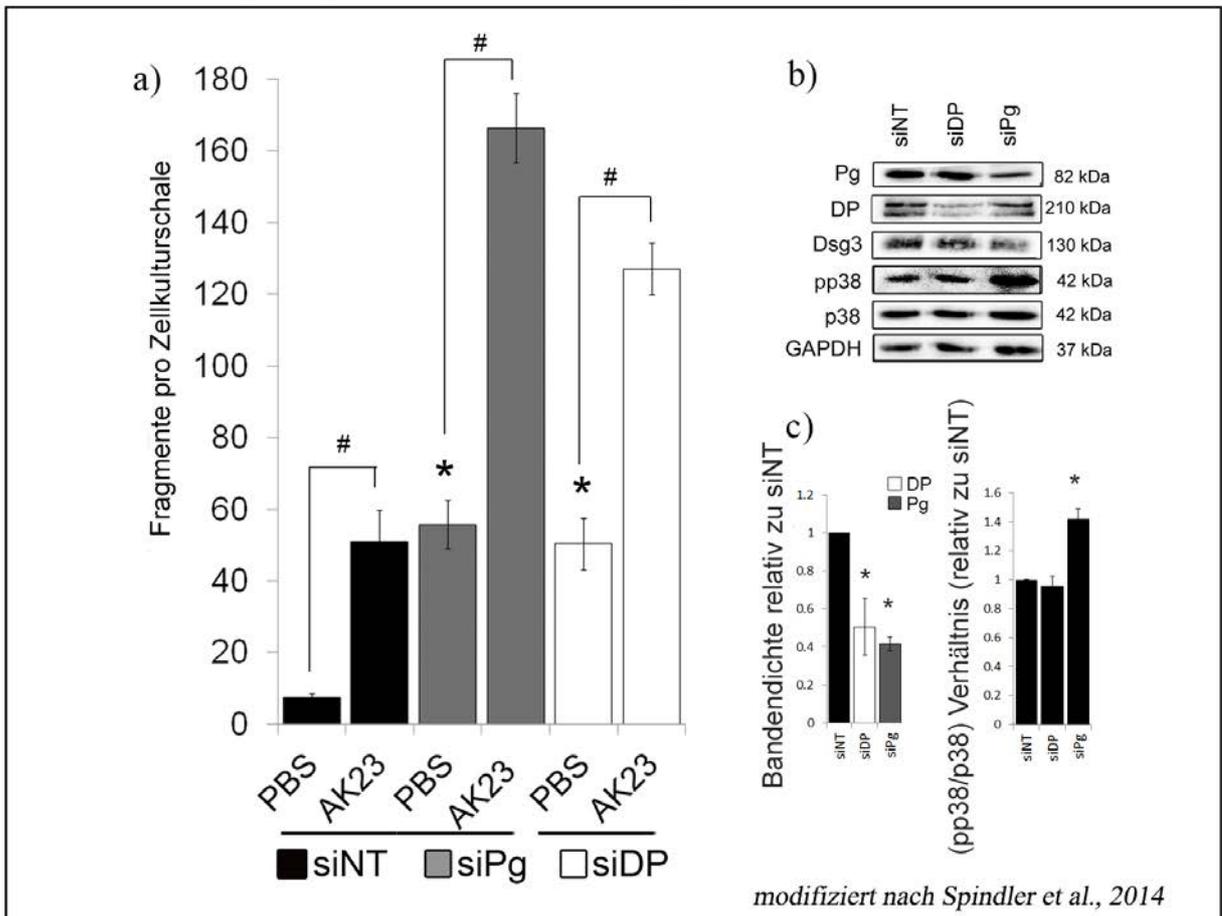
Eine Färbung von Pg und DP nach 24 h Inkubation mit dem monoklonalen anti-Dsg3-Antikörper AK23 oder PV-IgG zeigt, dass es im Falle von Pg zu einer deutlichen

Fragmentierung der Färbung entlang der Zellgrenzen kommt, wohingegen sich DP nahezu unbeeinflusst von diesen Mediatoren weiterhin linear entlang der Zellmembran zeigt (Abb. 8a). In Abbildung 8b ist ein Western Blot unter den gleichen Bedingungen zu erkennen, welcher es ermöglicht eben erwähnte Änderungen auf Proteinebene auch semi-quantitativ nachzuweisen. PV-IgG führt zu einer deutlichen Reduktion der Dsg3-Spiegel. Interessanterweise fand sich unter denselben Konditionen auch eine Verminderung der Pg-Spiegel, sowohl nach AK23- als auch nach PV-IgG-Behandlung (Abb. 8b). Für DP jedoch kommt es zu keinen signifikanten Änderungen. Die densitometrische Auswertung der Blots findet sich in Abbildung 8c.

3.2 Einfluss von Pg-Depletion auf den p38MAPK-vermittelten Zellhaftungsverlust

Mittels siRNA wurden in einem nächsten Schritt die beiden Proteine Pg und DP spezifisch herunterreguliert. Da die Aktivierung von p38MAPK einen wesentlichen Mechanismus in der Pathogenese von PV darstellt [74, 79], wurde diese im Hinblick auf eine mögliche Auswirkung auf die Proteine DP und Pg untersucht. Hierfür wurden sowohl DP als auch Pg spezifisch mittels siRNA depletiert, weitere 48 h später folgte eine Inkubation mit AK23 bzw. PBS als Kontrolle. Die erfolgreiche Depletion wurde in parallel durchgeführten Western Blots sichergestellt. Schon basal, also allein durch die Depletion, lässt sich wie in Abbildung 9 dargestellt in beiden Fällen eine deutlich höhere Fragmentbildung in Dispase-Versuchen erkennen (von $7,1 \pm 1,1$ (non-target-Kontrolle) auf $55,8 \pm 6,8$ (siPg) und $50,3 \pm 7,3$ (siDP)).

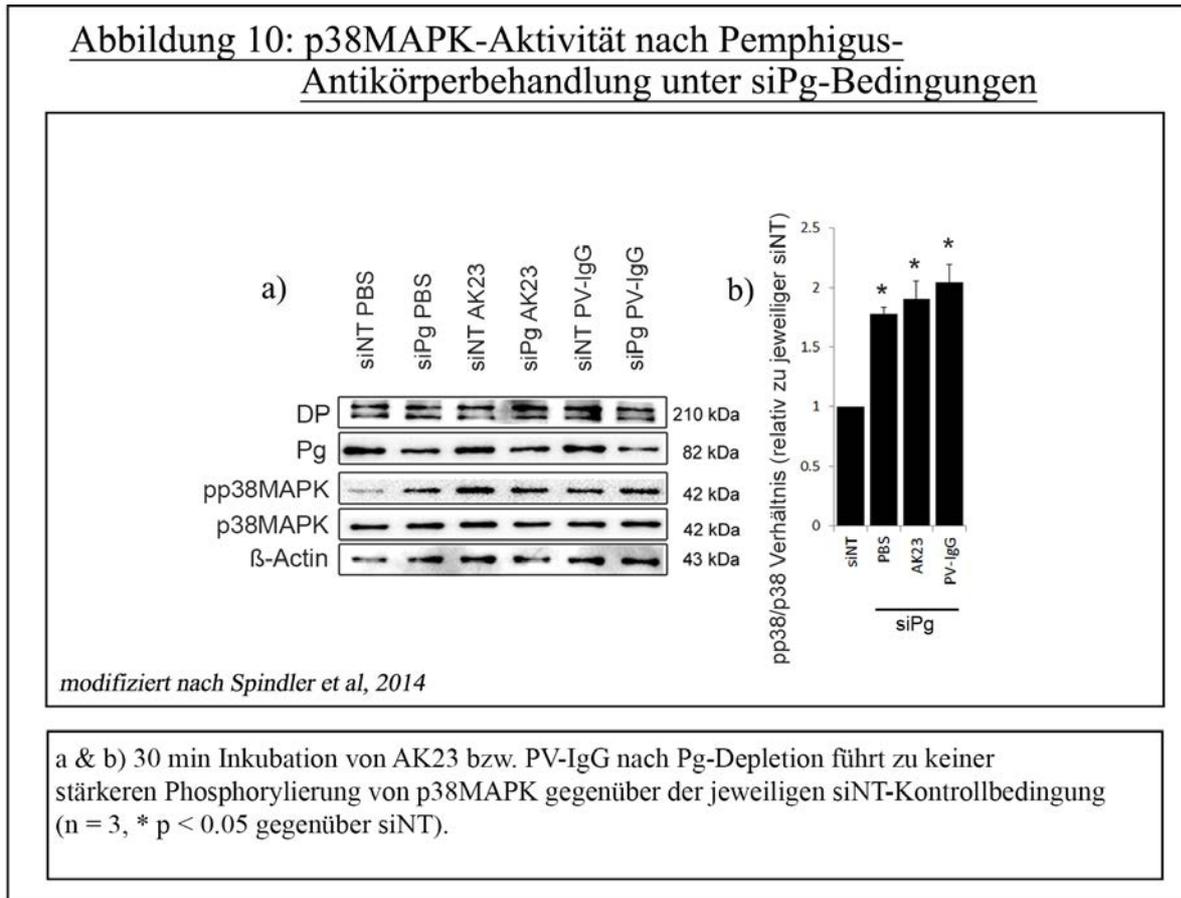
Abbildung 9: Einfluss von Pg- und DP-Depletion auf Zell-Zell-Haftung und p38MAPK-Aktivität



a) Spezifische Herunterregulation von Pg und DP mittels siPg bzw. siDP zeigt verminderte Zellhaftung in Dispase-Dissoziationsstudien sowohl unter Kontrollbedingung (PBS) als auch nach 24 h AK23 Inkubation. (n = 6, * p < 0.05 gegenüber siNT PBS, # p < 0.05)
 b & c) Verminderung von Pg, nicht aber DP führt zu verstärkter p38MAPK-Phosphorylierung. (n = 4, * p < 0.05 gegenüber siNT)

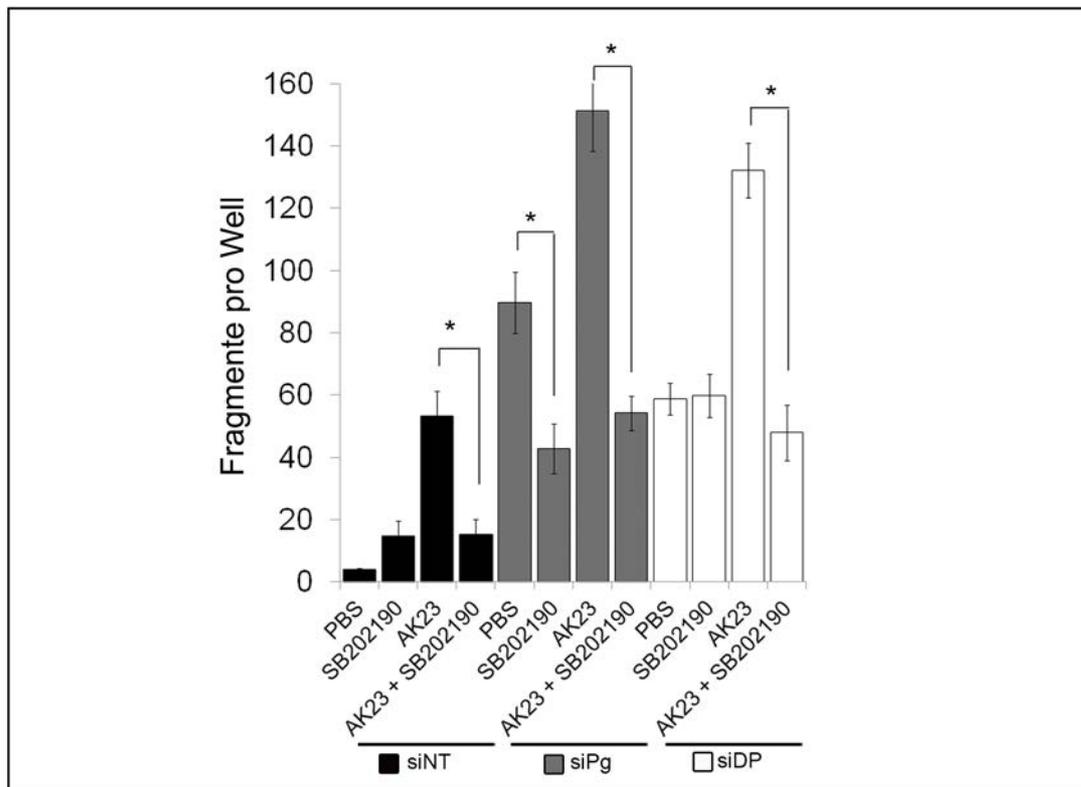
Interessanterweise konnte parallel dazu im Western Blot eine deutliche Aktivierung der p38MAPK im Falle der Pg-Depletion erkannt werden (Abb. 9b). Dies ließ sich hier in der verstärkten Phosphorylierung dieser Kinase im Vergleich zu Kontrollbedingungen erkennen, dargestellt als Ratio pp38MAPK/p38MAPK (Abb. 9c). Im Gegensatz dazu resultierte die siRNA-vermittelte Depletion von DP nicht in einer gesteigerten Phosphorylierung der p38MAPK.

Nach zusätzlicher 24 h Inkubation mit AK23, einem monoklonalen Autoantikörper gegen murines Dsg3 aus einem Pemphigus-vulgaris-Mausmodell stieg die Fragmentzahl in beiden Fällen noch erheblich an [(166,4 ± 9,7 und 127,2 ± 7,3)]. Dieser Befund korreliert jedoch weder für AK23 noch für PV-IgG (IgGs eines PV-Patienten) mit einer gesteigerten Phosphorylierung der p38MAPK (Abb. 10) schon nach 30-minütiger Inkubation.



Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die p38MAPK-Aktivierung nach Depletion von Pg mit dem Zelladhäsionsverlust zusammenhängen könnte. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Dissoziationsversuche dann unter Verwendung eines spezifischen Inhibitors der p38MAPK, SB202190 (Calbiochem) wiederholt (Abb. 11). Tatsächlich verringerte sich hiermit die durch Pg-Depletion induzierte Fragmentzahl von 89,7 ± 9,8 auf 42,8 ± 8,0 Fragmente nach 24 h Inkubation mit SB202190. Im Falle von DP-Depletion hingegen blieb die Fragmentzahl mit SB202190-Inkubation auf einem nahezu gleichen Niveau wie nach Herunterregulation von DP alleine (58,8 ± 5,0 gegenüber 59,8 ± 6,8 Fragmente). Somit führt eine Inhibition des p38MAPK-Weges nur im Falle von Pg-Depletion zu einem protektiven Effekt auf die Zellhaftung.

Abbildung 11: Einfluss der p38MAPK auf die Zell-Zell-Haftung

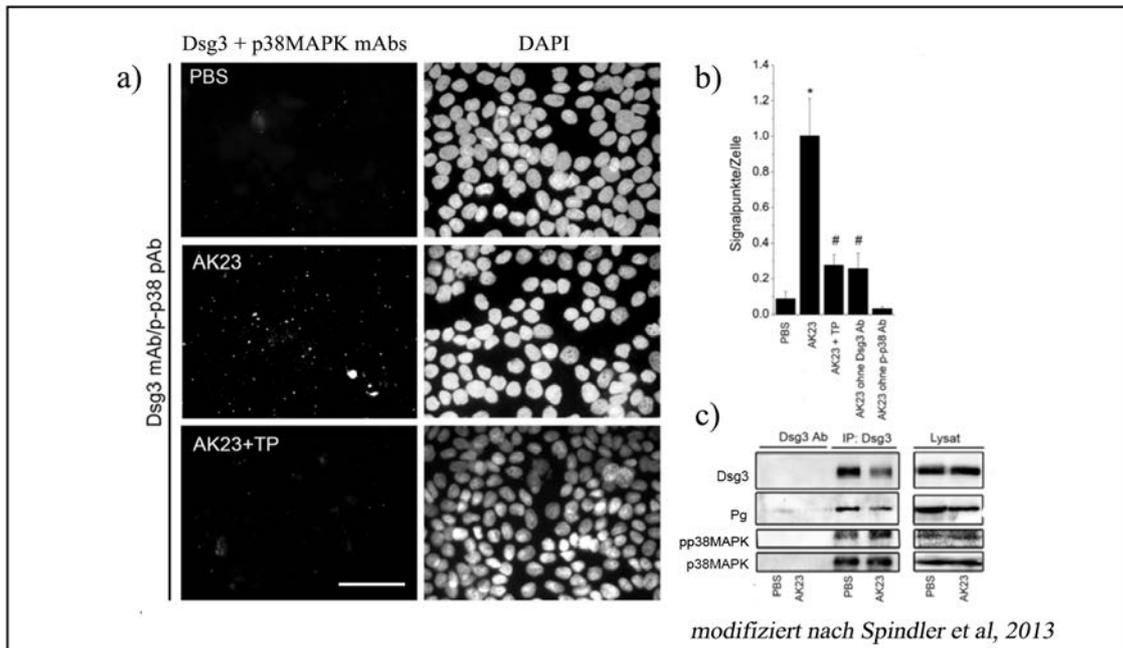


p38MAPK-Inhibition mittels SB202190 vermindert die Effekte von AK23 auf die Zellhaftung unter allen Bedingungen. Im Gegensatz zu siDP wird der durch siPg-Transfektion hervorgerufene Haftungsverlust durch p38MAPK-Inhibition reduziert. (n = 6, * p < 0.05)

Eine Ko-Inkubation mit SB202190 und AK23 hingegen blockierte im Vergleich zu AK23 alleine sowohl unter Kontrollbedingung, als auch nach siPg- bzw. siDP-Transfektion den zusätzlichen Haftungsverlust (Abb. 11). Im Falle von siPg + AK23 reduziert SB202190 die Fragmentzahl von $(151,2 \pm 12,8)$ auf $(54,3 \pm 6,2)$. Auch nach siDP-Transfektion reduziert SB202190 die AK23-vermittelte Fragmentierung von $(132,2 \pm 8,7)$ auf $(48,0 \pm 8,9)$ Fragmente. Zusammengefasst blockiert SB202190 den durch AK23 induzierten Haftverlust unter allen Bedingungen. Im Gegensatz zur siRNA-vermittelten Reduktion von DP kann der Haftungsverlust durch Herunterregulation von Pg durch p38MAPK-Inhibition partiell ausgeglichen werden. Zusammengefasst zeigen die Experimente, dass p38MAPK-Inhibition den Effekt der Pg-Depletion allein sowie den Effekt von AK23 auf die Zelladhäsion abmildern kann, nicht aber den Effekt der DP-Depletion.

3.3 Bedeutung des Komplex aus Dsg3, p38MAPK und Pg bei Pemphigus

Abbildung 12: Komplex aus Dsg3, pp38MAPK & Pg



a) Zu erkennen ist ein „Proximity-Ligations“-Versuch, mit dem sich nach 30 min Inkubation mit AK23 eine enge räumliche Nähe zwischen Dsg3 und pp38MAPK nachweisen lässt. Diese ist nicht mehr erkennbar, wenn mit TP für 30 min vorbehandelt wird. (Größenmaßstab = 50 µm). b) Die Auswertung zeigt die Anzahl an Signalpunkten pro Gesamtzahl an Zellen in jeweils 3 unabhängigen Versuchen (* $p < 0.05$ gegenüber Kontrolle, # $p < 0.05$ gegenüber AK23). c) Eine Immunpräzipitation von Dsg3 zeigt die Verbindung zwischen Dsg3, Pg, p38MAPK und pp38MAPK. Eine 30 min Inkubation mit AK23 zeigt eine verstärkte Phosphorylierung von p38MAPK an Dsg3 (n = 3).

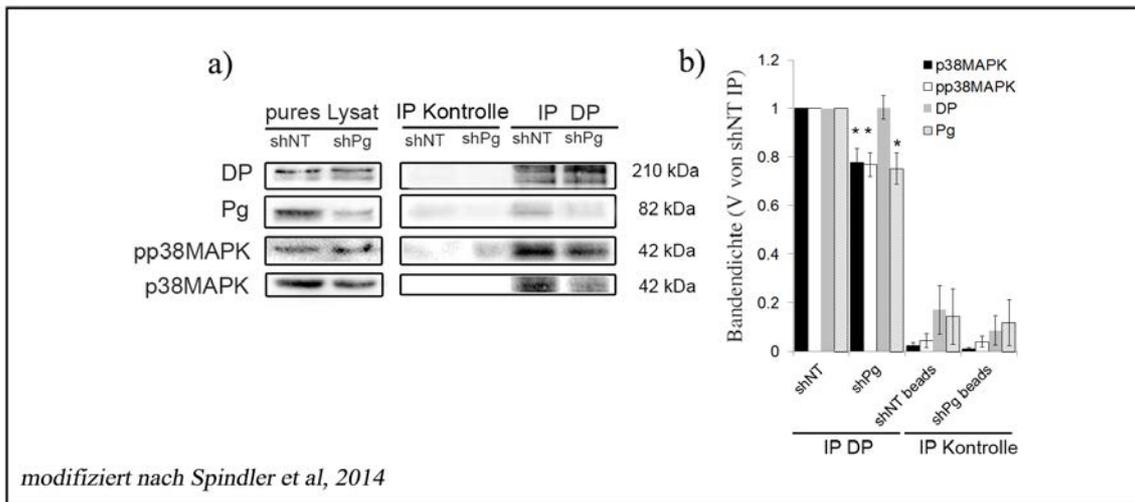
Zur Untersuchung der Mechanismen, wie desmosomale Proteine p38MAPK regulieren können, wurde die Ko-lokalisierung zwischen Dsg3 und aktivierter p38MAPK untersucht. Die sogenannte „Proximity-Ligation“-Methode (PLA) ist eine relativ neue Methode, mithilfe derer man sehr kurze räumliche Distanz zwischen zwei Proteinen nachweisen kann (≈ 40 nm). Im vorliegenden Fall untersuchten wir, ob Dsg3 mit der aktivierten p38MAPK kolokalisiert und ob sich dies bei einer verstärkten Aktivierung, z.B. nach Inkubation mit AK23, ändert. Abb. 12a zeigt, dass in der Tat positive PLA-Signale unter Kontrollbedingungen zwischen Dsg3 und pp38MAPK zu finden sind. Die Inkubation mit AK23 führte zu einer deutlichen Steigerung des Signals, d.h. wahrscheinlich zu einer Translokation von pp38MAPK zu Dsg3. Interessanterweise konnte das sogenannte Tandempeptid (kurz: „TP“), ein Desmoglein-Quervernetzungs-

Peptid [80], diese Ko-lokalisierung wieder reduzieren, es lagen weniger pp38MAPK-Moleküle vor. Die Negativkontrollen zeigten nur leichte, unspezifische Signale. Die statistische Auswertung der Anzahl der PLA-Signale pro Zelle ist in Abb. 12b dargestellt. In einem nächsten Schritt wurden Immunpräzipitationen durchgeführt, da hierdurch nicht nur enge Nähe, sondern eine direkte bzw. indirekte Interaktion zweier Moleküle nachgewiesen werden kann.

Hierfür wurde Dsg3 immunpräzipitiert (Abb. 12c). In der Tat lassen sich sowohl p38MAPK wie auch pp38 MAPK ko-präzipitieren. Interessanterweise findet sich nach 30 min Vor-Inkubation mit AK23 eine erhöhte Menge der phosphorylierten und damit aktivierten Form von p38MAPK an Dsg3 gebunden.

Neben p38MAPK konnte auch Pg in diesem Komplex detektiert werden. Somit könnten Dsg3 und Pg eine Gerüst-Funktion ausüben, die wichtig für die Kontrolle der p38MAPK-Aktivität ist.

Abbildung 13: Pg stabilisiert p38MAPK am Desmosom



a) Immunpräzipitation von DP nach shPg. b) Densitometrische Auswertung
 Zu erkennen ist, dass p38MAPK und pp38MAPK einen Komplex mit DP und Pg bilden. Nach Depletion von Pg mittels shRNA vermindert sich die Menge an p38MAPK und pp38MAPK in dem Komplex (n = 4, * p < 0,05 gegenüber Kontroll-shRNA (shNT)).

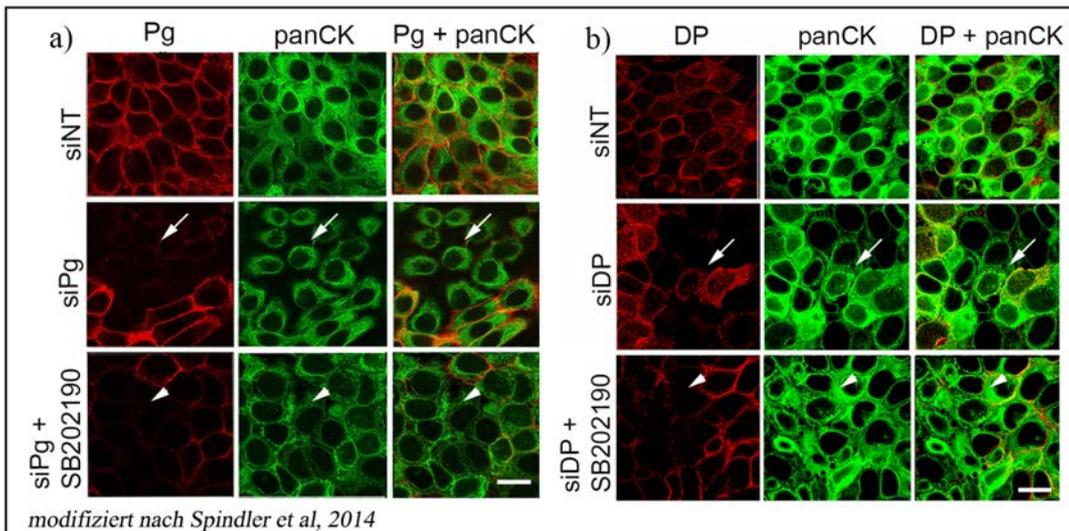
Um die Rolle von Pg in diesem Komplex zu untersuchen, wurde Pg mittels shRNA herunterreguliert und Immunpräzipitationen von DP durchgeführt. Während sich hierbei unter Kontrollbedingungen (shNT) eine deutliche Ko-Immunpräzipitation und somit eine Verbindung von p38MAPK mit DP nachweisen lässt, so ist dies nach

vorheriger Depletion von Pg deutlich reduziert (Abb. 13). Daraus lässt sich schließen, dass Pg wichtig für die Verankerung von p38MAPK am Desmosom ist.

3.4 Einfluss von Pg-Depletion auf die Keratinfilament-Retraktion

Ein weiterer typischer Biopsiefund bei PV-Patienten ist die Keratinfilament-Retraktion, welche sich auch im in-vitro-Modell durch Inkubation von Pemphigus-Autoantikörpern reproduzieren lässt. Konkret handelt es sich dabei um eine verminderte desmosomale Verankerung von Intermediärfilamenten, welche sich daraufhin vermehrt um den Zellkern lokalisieren und somit von der Zellmembran retrahiert erscheinen. Zur Untersuchung der Pg- bzw. DP-Abhängigkeit wurden Immunfärbungen angefertigt. Man fand eine massive Retraktion des Keratinfilament-Netzwerkes infolge spezifischer Herunterregulation von Pg vor (Abb. 14a). Nach Depletion von DP (Abb. 14b) konnte interessanterweise kaum ein Effekt auf die Keratinfilamentstruktur nachgewiesen werden.

Abbildung 14: Pg-Reduktion induziert eine Keratinfilament-Retraktion



a) Depletion von Pg führt zu einer Retraktion der Keratinfilamente (Pfeile). Diese kann durch 8 h Vorinkubation von SB202190 vermindert werden (Pfeilköpfe).
 b) Im Gegensatz zu Pg resultiert die gezielte Depletion von DP in keiner Retraktion der Keratinfilamente (Pfeile). Auch SB202190, der spezifische Inhibitor der p38MAPK, hat keinen Effekt (Pfeilköpfe) (Größenmaßstab = 20 μ m). Bilderabfolge zeigt repräsentative Bilder von 3 unabhängigen Versuchen.

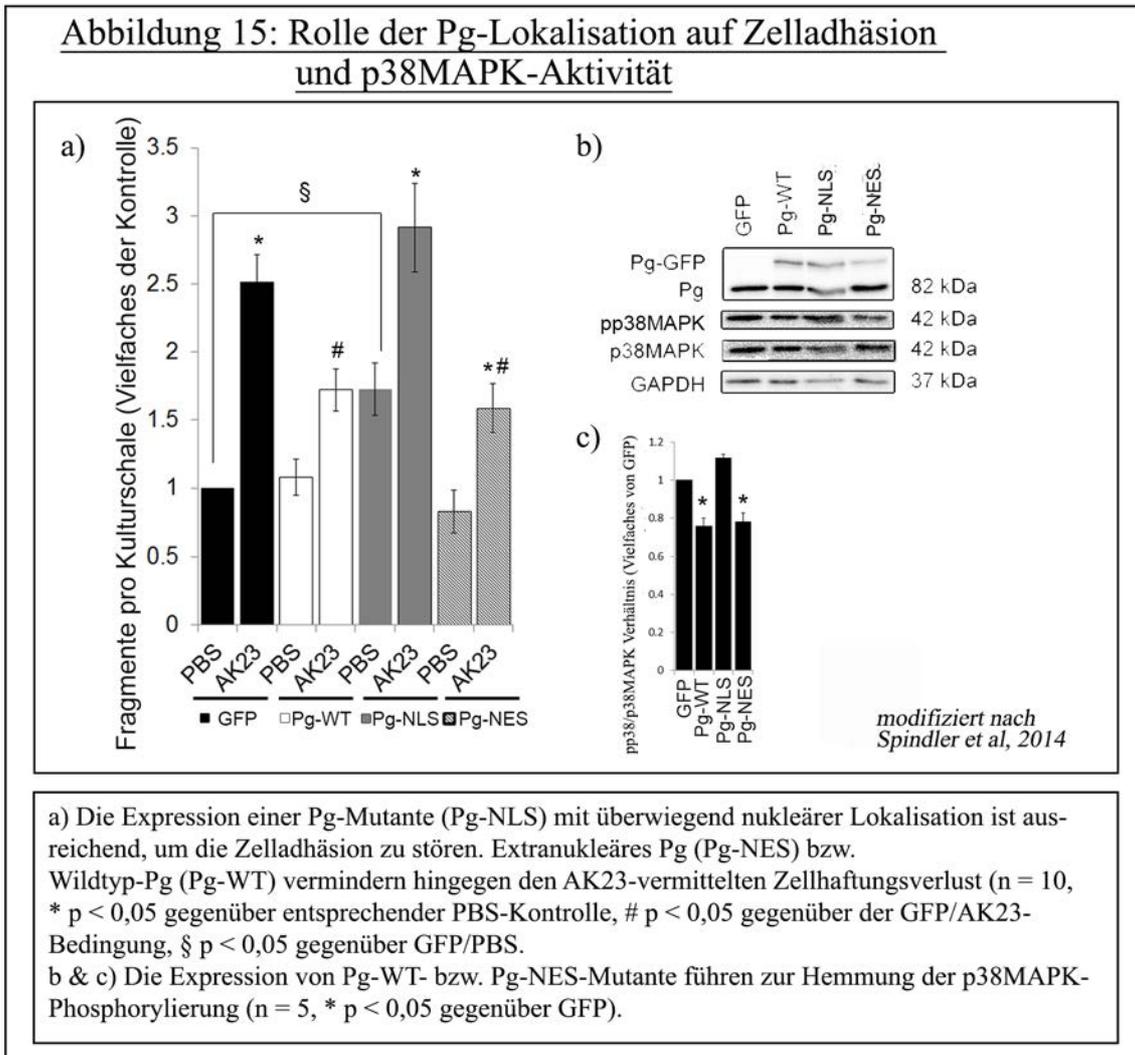
Es ist bereits bekannt, dass das Phänomen der Keratinfilament-Retraktion bei Pemphigus ein zumindest z.T. durch p38MAPK vermittelter Prozess ist [65, 79]. Um eine mögliche Abhängigkeit von p38MAPK nach Depletion von Pg zu untersuchen, wurde eine 8 h Inkubation mit 20 μmol SB202190, dem p38MAPK-Inhibitor, durchgeführt. Tatsächlich zeigt sich ein deutlich protektiver Effekt auf den durch Pg-Reduktion hervorgerufenen Kollaps der Keratinfilamente. Im Falle der DP-Reduktion zeigte sich kein signifikanter Effekt durch den Inhibitor. Dies zeigt, dass die Retraktion der Keratinfilamente nach Pg-Depletion zumindest teilweise abhängig von der Aktivität von p38MAPK ist.

3.5 Bedeutung der Lokalisation von Pg für p38MAPK-Aktivität, Zellhaftung, Zytokeratin-Verteilung und Dsg3-Depletion

Durch die vorhergehenden Versuche konnte nun von einer Interaktion zwischen Dsg3, Pg und der p38MAPK ausgegangen werden. Weiterhin ist es wichtig, die Rolle von Pg in Bezug auf p38MAPK zu untersuchen. Da bekannt ist, dass Pg sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch bzw. an den Zellkontakten lokalisiert ist, untersuchten wir die Relevanz der Lokalisation von Pg auf den p38MAPK-Signalweg. Hierfür wurden von PD Stefan Hübner (Universität Würzburg) Pg-Konstrukte zur Verfügung gestellt, die mit einer nukleären Lokalisationssequenz (NLS) oder einer nukleären Exportsequenz (NES) versehen waren. Als passende Kontrollen dienten ein Wildtyp-Pg-Konstrukt, welches sowohl nukleär als auch extranukleär zu finden war, sowie ein GFP-Leervektor.

Zur Untersuchung der Zellhaftung wurden zunächst Dissoziationsversuche nach Expression der Pg-Konstrukte durchgeführt (Abb. 15a). Die HaCaT-Zellen wurden hierfür mit den entsprechenden DNA-Konstrukten (1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) transfiziert und z.T. mit AK23 (75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) für 24 h inkubiert. Grundsätzlich ließ sich eine gesteigerte Fragmentanzahl unter Pg-NLS-Expression, also des überwiegend nukleär lokalisierten Pg ($1,7 \pm 0,2$ Vielfache der Kontrolle) im Vergleich zu Pg, also dem membranären Pg ($0,8 \pm 0,2$ Vielfache der Kontrolle) oder Pg-WT Expression ($1,1 \pm 0,2$ Vielfache der Kontrolle) erkennen. Des Weiteren verminderten Pg-WT und Pg-NES (jeweils $1,7 \pm 0,2$ und $1,6 \pm 0,2$ Vielfache der Kontrolle), den durch AK23 induzierten Zelladhäsionsverlust ($2,5 \pm 0,2$ Vielfache der Kontrolle). Die nukleäre Lokalisation von Pg hatte hingegen keinerlei protektiven Effekt.

Mittels Western Blot stellte sich heraus, dass sowohl der Wildtyp als auch das extranukleär lokalisierte Pg im Vergleich zur GFP-Kontrolle verminderte pp38MAPK-Spiegel (nicht signifikant) zeigten (Abb. 15b, c). Zellen, die mit Pg-NLS transfiziert waren, wiesen dagegen sogar eine leicht erhöhte p38MAPK-Aktivität auf (nicht signifikant).



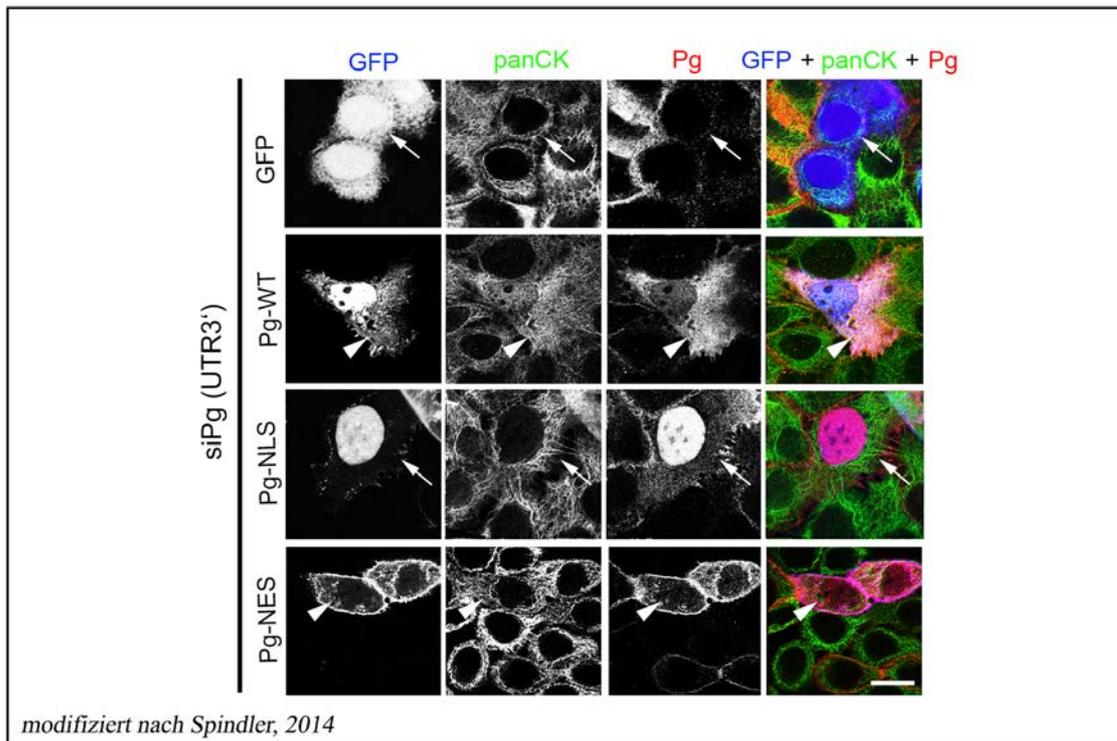
In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die unterschiedliche Lokalisation von Pg Auswirkungen auf die Keratinfilament-Verankerung hat, was relevant für den Mechanismus des Zellhaftungsverlusts sein könnte.

Hierfür wurde durch Depletion von Pg zunächst eine Retraktion der Keratinfilamente induziert. Um hierbei in erster Linie das endogene Pg zu reduzieren und so die direkte Auswirkung der Pg-Lokalisation untersuchen zu können, wurde eine siRNA eingesetzt,

die sich gegen das 3'UTR-Ende der endogenen Pg-mRNA richtet und somit nicht an den transfizierten Konstrukten angreift.

In den Zellen, die das jeweilige GFP-gekoppelte Konstrukt exprimieren, wurde untersucht, ob die durch Pg-siRNA induzierte Keratinfilament-Retraktion gehemmt wird.

Abbildung 16: Extranukleäres Pg verhindert die Keratinfilament-Retraktion

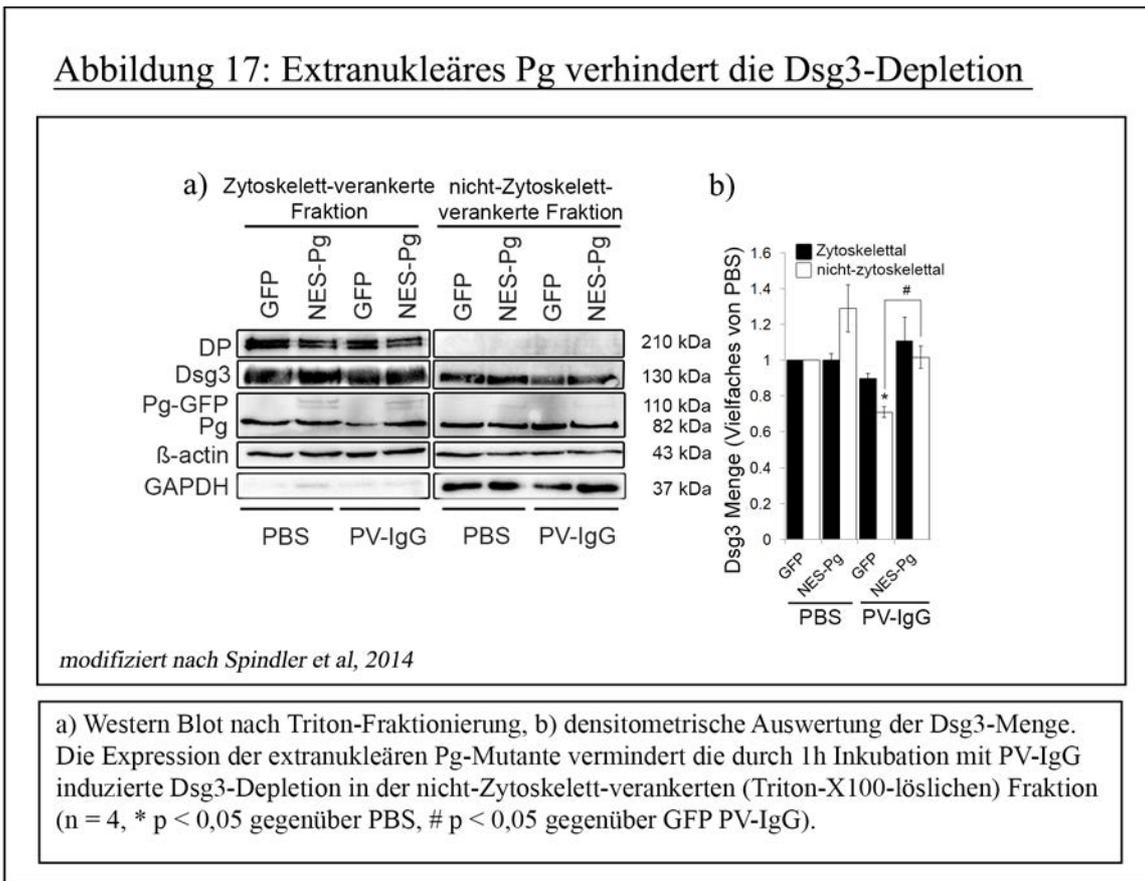


In der Immunfluoreszenzdarstellung erkennt man, dass es durch Pg-Depletion (siPg - gezielt gegen 3'UTR von endogenem Pg gerichtet), wie vorher gezeigt zu einer Keratinfilament-Retraktion kommt auch wenn der GFP-Leervektor oder Pg-NES exprimiert wurden (Pfeile 1. & 3. Reihe). Pg-WT- bzw. Pg-NES exprimierende Zellen hingegen zeigen verminderte Retraktion (Pfeilköpfe) (Größenmaßstab = 10 µm). Jede Bildreihe zeigt repräsentative Bilder aus 3 unabhängigen Versuchen.

Hier zeigte sich, dass sowohl der Wildtyp als auch das extranukleäre Pg die Retraktion vermindern können (siehe Abb. 16), wohingegen beim nukleären Pg weiterhin eine deutliche Retraktion zu erkennen war. Somit lässt sich schlussfolgern, dass Pg an der Membran wichtig für die Verankerung der Keratinfilamente ist.

Daran anschließend wurde untersucht, ob sich extranukleäres Pg positiv auf die Dsg3-Depletion nach Pemphigus-Antikörpergabe auswirken könnte.

Abbildung 17: Extranukleäres Pg verhindert die Dsg3-Depletion



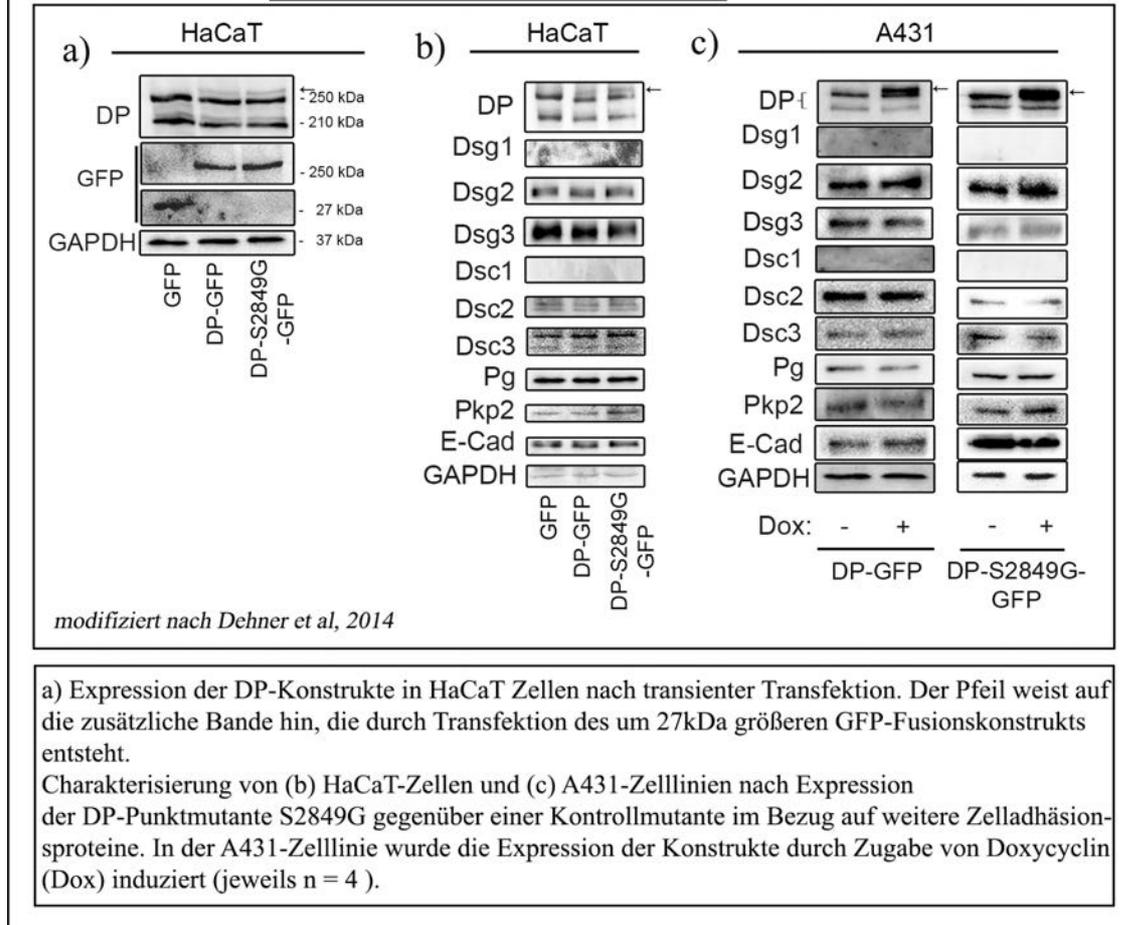
Hierfür wurden Triton-Extraktionsversuche durchgeführt, durch die das Zelllysate in einen Zytoskelett-verankerten und einen nicht mit dem Zytoskelett-verankerten Teil unterteilt wurde. In Zellen, die mit dem NES-Pg-Konstrukt transfiziert wurden, war im Gegensatz zu GFP-Leervektor-transfizierten Zellen die Depletion von Dsg3 in der nicht-Zytoskelett-verankerten Fraktion vermindert (Abb. 17a, b).

3.6 Die Wirkung der DP-Punktmutante auf die Zelladhäsion in HaCaTs

Nachdem im ersten Teil die Rolle von Pg im Fokus dieser Arbeit stand, wurde im zweiten Teil DP untersucht.

Um die Relevanz von DP auf die Zellhaftung und bei Pemphigus zu beleuchten, nutzten wir eine Punktmutante von DP die von Prof. Kathleen Green (PhD, Northwestern University, Chicago, US) zur Verfügung gestellt wurde. Bei dieser wurde Serin durch Glycin an Position 2849 ausgetauscht. „DP-S2849G-GFP“ führt zu einer stärkeren Verbindung an die Keratinfilamente und könnte somit die Zelladhäsion stärken [81].

Abbildung 18: Charakterisierung von DP-S2849G-GFP in verschiedenen Zelllinien mittels Western Blot



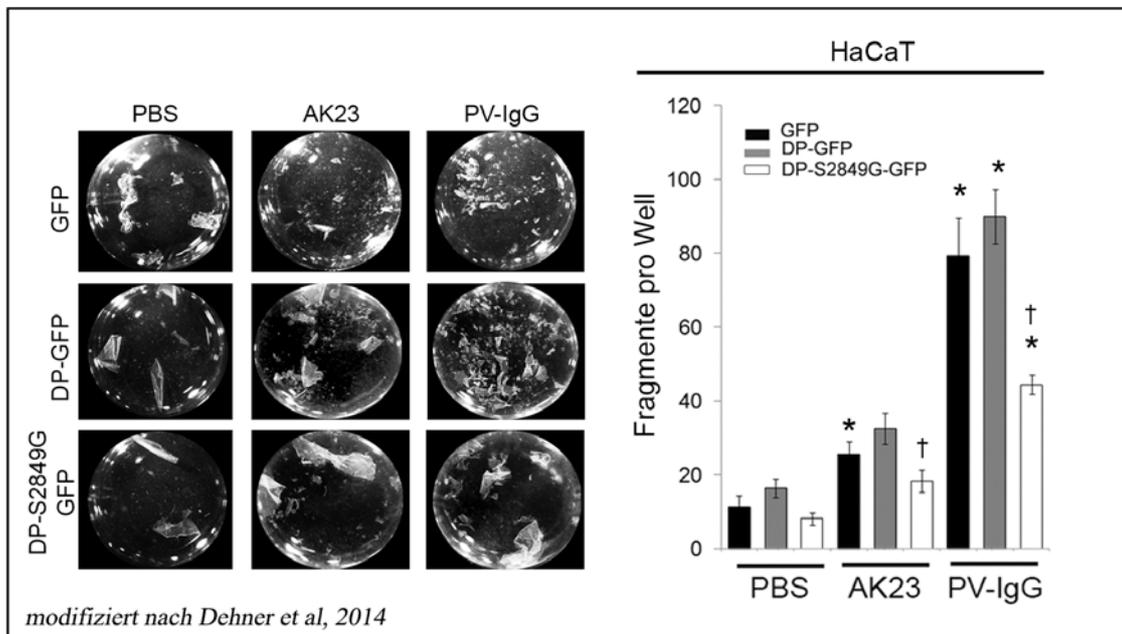
Hierfür wurden zunächst die HaCaT-Zellen transient mit dem Konstrukt transfiziert. Als Kontrollen dienten ein Wildtyp-DP-GFP-Konstrukt und ein GFP-Leerkonstrukt (Abb. 18a). Die Expression dieser Konstrukte wurde mittels Western Blot sichergestellt. Initial wurde untersucht, ob die erhöhte Expression von DP die Expression anderer desmosomaler Proteine ändert. Abbildung 18 zeigt die Expressionsspiegel von Dsg1-3, Dsc1-3, sowie Pkp2 und E-Cadherin und Pg. Ein deutlicher Unterschied wurde bei keinem dieser Moleküle festgestellt.

Als zweites Modell wurde eine stabile Zelllinie (Prof. Kathleen Green, PhD, Northwestern University, USA) genutzt, welche die Mutante bzw. die Kontroll-DNA nach Induktion mittels des Antibiotikums Doxycyclin exprimiert. Es handelt sich hierbei um eine modifizierte A431-Zelllinie, die ursprünglich aus einem humanen Epidermoid-Tumor isoliert wurde [82]. Diese Zelllinie bietet somit im direkten Vergleich mit den transient transfizierten Zellen die Möglichkeit, langfristige Änderungen im Vergleich zu kurzfristigen zu untersuchen. Abbildung 19c zeigt, dass im

Hinblick auf weitere desmosomale Moleküle und E-Cadherin keine Veränderungen vorhanden sind.

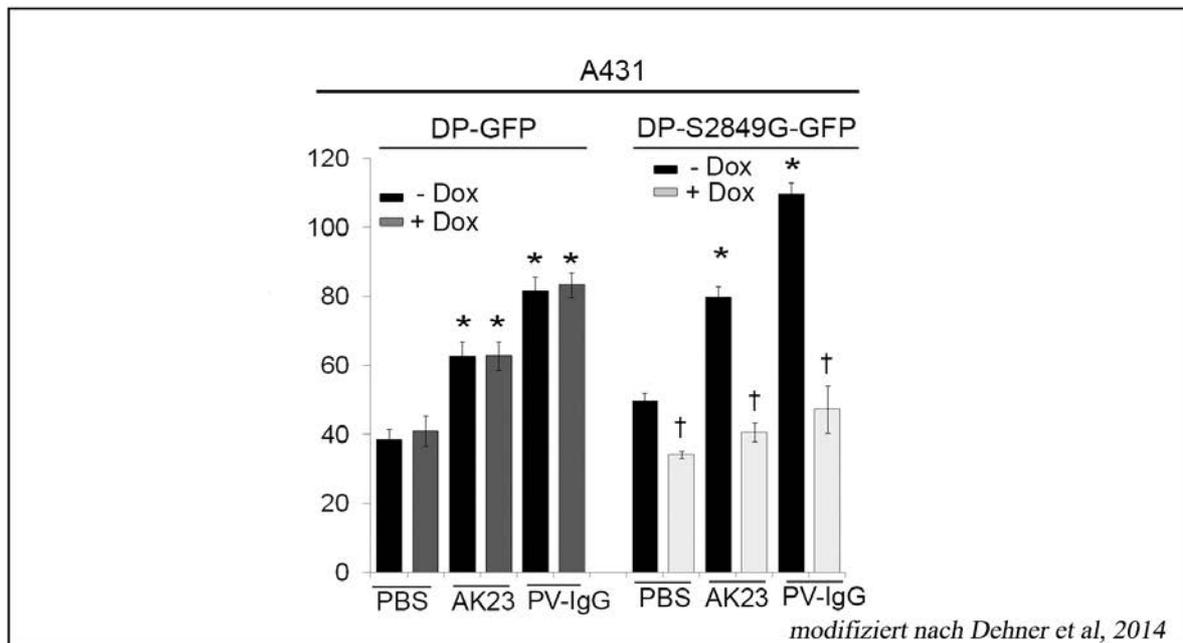
Im nächsten Schritt wurden Zelldissoziationsversuche mit den transfizierten Zellen unter Kontrollbedingungen und jeweils nach AK23- und PV-IgG-Inkubation durchgeführt (Abb. 19). Während DP-GFP gegenüber GFP-Leervektor keine Effekte zeigte, reduzierte DP-S2849G-GFP die durch die Autoantikörperinkubation induzierte Fragmentbildung signifikant.

Abbildung 19: Auswirkung von DP-S2849G-GFP auf die Zellhaftung in HaCaT-Zellen



Mit DP-S2849G-GFP-transfizierte HaCaT-Zellen zeigen in Dissoziationsversuchen eine verminderte Fragmentierung nach 24 h AK23- bzw. PV-IgG-Inkubation (n = 9, * p < 0,05 gegenüber PBS GFP, † p < 0,05 gegenüber DP-GFP).

Abbildung 20: Auswirkung von DP-S2849G-GFP auf die Zellhaftung in A431-Zellen



DP-S2849G-GFP-exprimierende A431-Zellen zeigen in Dissoziationsversuchen eine gesteigerte Zell-Zell-Adhäsion sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach AK23- und PV-IgG-Inkubation (n = 9, * p < 0,05 gegenüber entsprechender PBS-Kontrolle, † p < 0,05 gegenüber entsprechender - Dox-Bedingung).

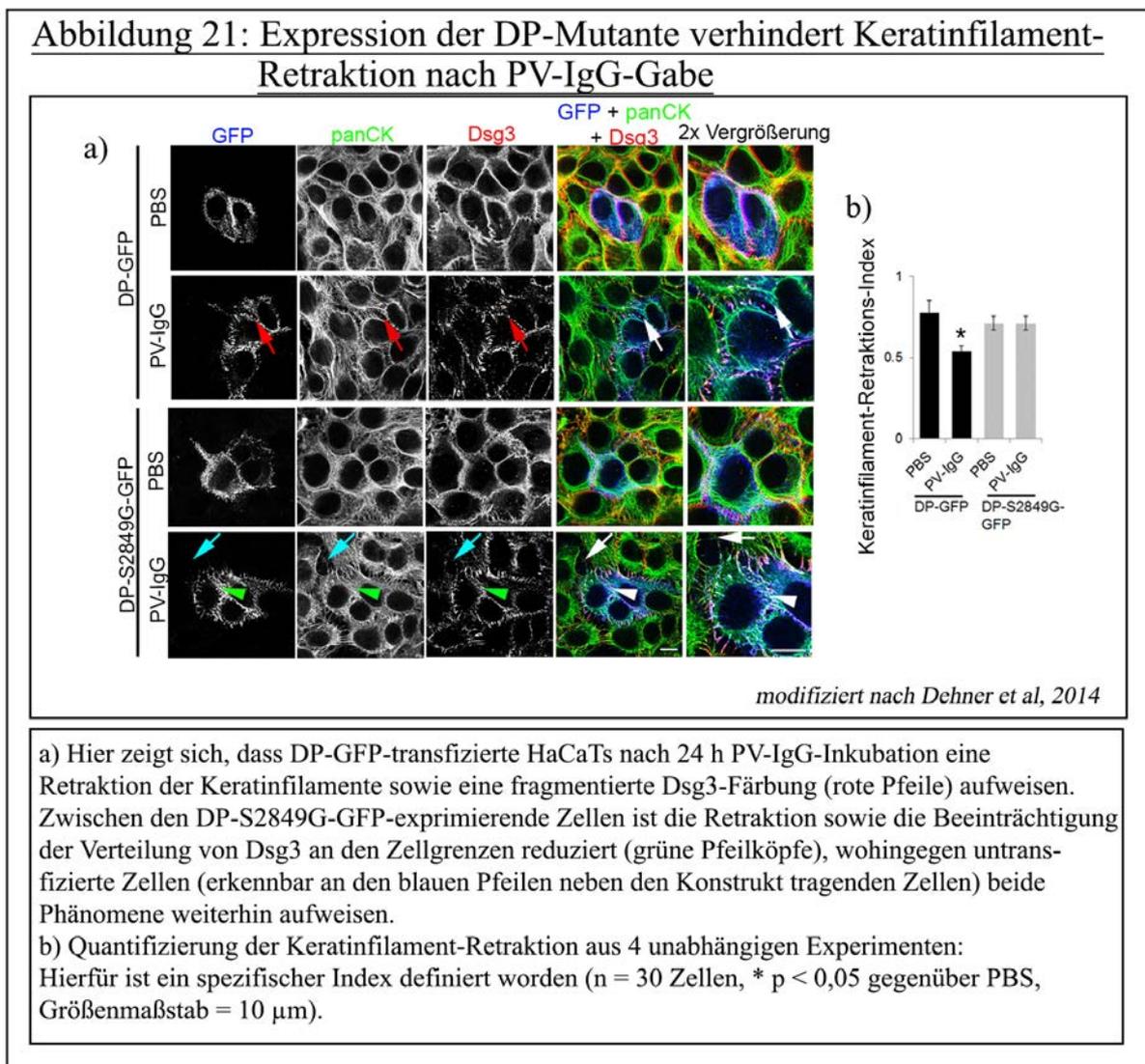
Die gleichen Untersuchungen wurden nun mit den induzierten A431-Zelllinien gemacht (Abb. 20). Zur Induktion wurde Doxycyclin in einer Konzentration von 3 µg/ml für 48 h zugegeben, was eine ausreichende Expression gewährleistete (siehe auch Abb. 18).

Nach Erreichen der Konfluenz sowie nach 24 h Induktion mit Doxycyclin wurde für weitere 24 h mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert.

Interessanterweise zeigen beide A431-Zelllinien basal bereits mehr Fragmente im Vergleich zur HaCaT-Linie, was sich als zelltypspezifischer Unterschied interpretieren lässt.

3.7 Effekte der DP-Mutante auf die Keratinfilament-Retraktion und Dsg3-Depletion

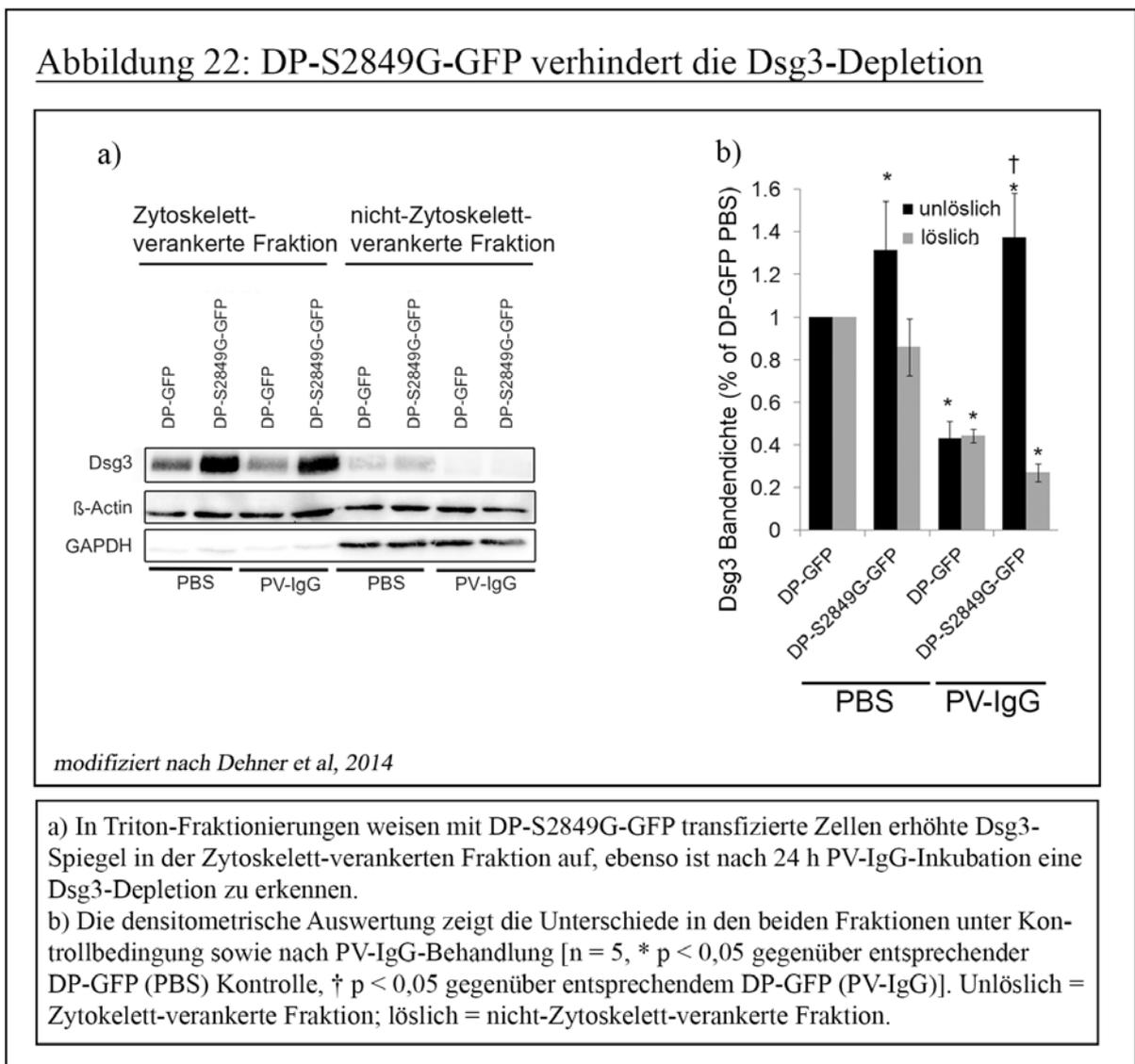
Die bessere Verankerung an die Keratinfilamente bei der DP-Mutante lässt die Vermutung aufkommen, dass dadurch ein positiver Effekt auf die Keratinfilament-Retraktion gegeben sein könnte. Um dies zu untersuchen, wurden HaCaT-Zellen, welche 24 h zuvor mit den Konstrukten transfiziert worden waren, mit PV-IgG für weitere 24 h induziert (Abb. 21). Tatsächlich verhinderte DP-S2849G-GFP im Gegensatz zu DP die Retraktion. Zusätzlich zeigte sich in der Dsg3-Färbung eine reduzierte Fragmentierung.



Dies lässt die Vermutung zu, dass durch Expression von DP-S2849G-GFP die Dsg3-Depletion vermindert wird. Um dies detaillierter zu untersuchen, wurden in HaCaT-Zellen Triton-Extraktionsversuche wie vorher beschrieben durchgeführt.

Abbildung 22 zeigt, dass die Expression von DP-S2849G-GFP im Vergleich zu DP-GFP schon unter basalen Bedingungen zu deutlich höheren Dsg3-Spiegeln sowohl in der Zytoskelett-gebundenen als auch in der nicht-Zytoskelett-verankerten Fraktion führt.

Zusätzlich ließ sich die durch PV-IgG auftretende Dsg3-Depletion durch das DP-S2849G-GFP Konstrukt in der Zytoskelett-verankerten Fraktion effizient verhindern.



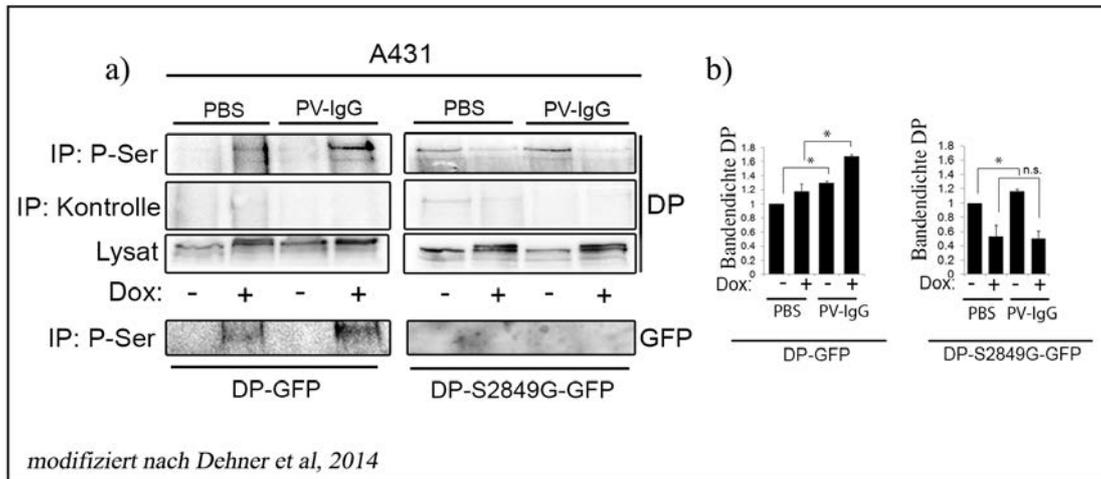
Somit scheint eine verstärkte Verankerung der Zytokeratinfilamente die Dsg3-Menge innerhalb des Desmosoms zu regulieren.

3.8 Bedeutung von PKC für die DP-Phosphorylierung

Der Serin-Rest an Position 2849 stellt eine potentielle Phosphorylierungsstelle von PKC dar [81]. Um zu untersuchen, ob PV-IgG zu einer Phosphorylierung von DP an dieser Stelle führen, wurden im Folgenden Immunpräzipitationen mit einem Pan-Phospho-Serin-Antikörper durchgeführt (Abb. 23). Tatsächlich konnte nach 15 min PV-IgG-Inkubationen im Vergleich zur Kontrollbedingung eine erhöhte Menge an endogenem DP sowie von DP-GFP heruntergezogen werden. Dies zeigt eine verstärkte Phosphorylierung von endogenem DP sowie des WT-Konstrukts an.

Die Durchführung des Versuchs unter Induktion der phosphodefizienten Punktmutante zeigt, dass sich eine deutlich geringere Menge DP nach Immunpräzipitation von Phospho-Serin detektieren lässt, und zwar sowohl unter Kontrollbedingung als auch nach 15 min PV-IgG-Inkubation. Zusätzlich ließ sich kein GFP-Signal mehr im Präzipitat nachweisen, was zum einen zeigt, dass DP-S2849G-GFP nicht mehr phosphoryliert werden kann, zum anderen, dass dieser Serinrest vermutlich die wesentliche Phosphorylierungsstelle von DP nach PV-IgG-Inkubation darstellt. Interessanterweise führt die Expression der Mutante zu einer reduzierten Phosphorylierung auch des endogenen DP.

Abbildung 23: PV-IgG führen zur DP-Phosphorylierung an Position 2849



modifiziert nach Dehner et al, 2014

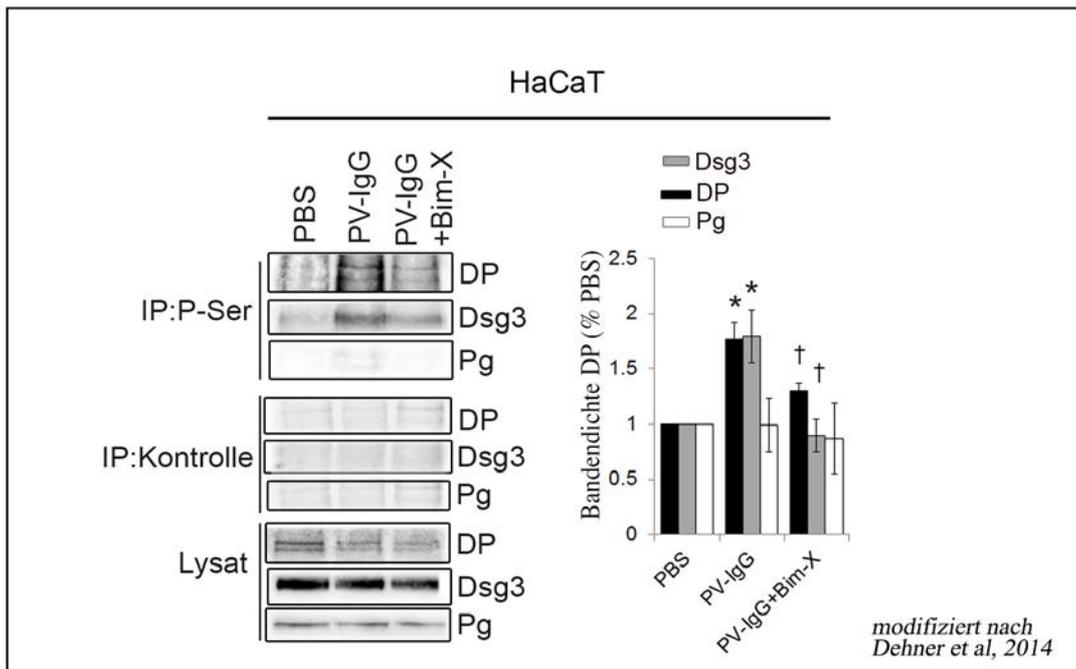
a) Immunpräzipitation von Phospho-Serin-Resten (P-Ser) in A431-Zellen zeigt, dass es nach 15 min Inkubation mit PV-IgG zu einer verstärkten DP-Phosphorylierung in Doxycyclin-behandelten und daraufhin DP-GFP exprimierenden A431-Zellen kommt. Dies ist nach Induktion von DP-S2849G-GFP nicht nachweisbar. Die nach Induktion DP-S2849G-GFP exprimierenden Zellen weisen verminderte Phosphorylierung von DP unabhängig von PV-IgG-Inkubation auf.
 b) Densitometrische Auswertung der DP-Menge gegenüber entsprechender Kontrolle (n = 5, * p < 0,05).

Um nun die vermutete PKC-Abhängigkeit der Phosphorylierung von DP zu untersuchen, wurde ein spezifischer Inhibitor dieser Kinase verwendet, BIM-X. Nach 1 h Vorinkubation von Bim-X (1 μ M) wurde anschließend weitere 15 min mit PV-IgG inkubiert und unter diesen Bedingungen die DP-Phosphorylierung anhand der Menge des über den Phospho-Serin-Antikörper ko-präzipitierten DP detektiert.

Abbildung 24 zeigt, dass PV-IgG auch in den nun verwendeten HaCaT-Zellen zu einer vermehrten Phosphorylierung von DP führt, wohingegen die Phosphorylierung in der Kombination aus Autoantikörpern und Inhibitor signifikant reduziert ist. Auch Dsg3 wird unter dieser Bedingung phosphoryliert. Dies deutet eine PKC-Abhängigkeit der DP-Phosphorylierung nach Inkubation mit PV-IgG an. Für Pg hingegen zeigt sich keine Phosphorylierung, weder unter Kontrollbedingung noch unter Autoantikörperzugabe.

Um besser zu verstehen, wie die DP-Punktmutante zur Reduktion der Phosphorylierung von endogenem DP (DP-GFP) führen kann, wurde Rack1 untersucht.

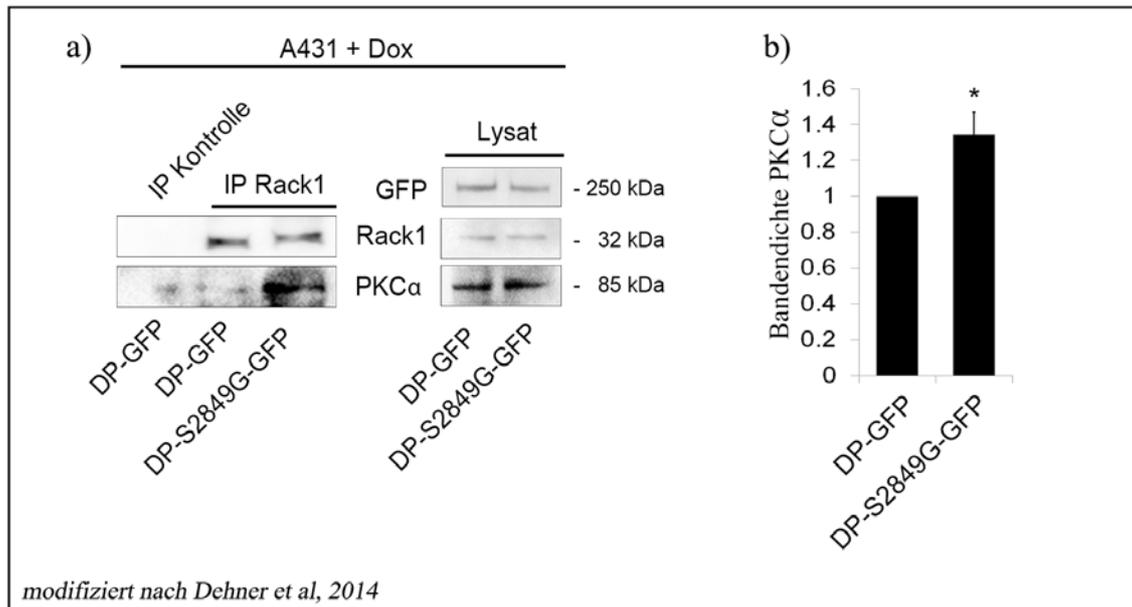
Abbildung 24: PKC-Inhibition vermindert die DP-Phosphorylierung nach PV-IgG-Inkubation



Immunpräzipitation von phosphorylierten Serin-Resten und anschließender Koimmunopräzipitation. PV-IgG führt zu PKC-abhängiger Phosphorylierung von DP, Dsg3 und Pg. HaCaT-Zellen weisen nach 15 min PV-IgG-Inkubation eine erhöhte Phosphorylierung von DP und Dsg3 auf, welche durch den spezifischen PKC-Inhibitor BIM-X reduziert wurde. Im Gegensatz zu DP und Dsg3 wird Pg nicht phosphoryliert. (n = 4, * p < 0,05, † p < 0,05).

Es wurde vorgeschlagen, dass Keratinfilamente die Bindung von Rack1 an PKC modulieren. Hierbei verminderte eine erhöhte Bindung die Aktivität von PKC. Um diesen Mechanismus hier zu untersuchen, führten wir Immunpräzipitationen von Rack1 in den A431-Zellen durch. Interessanterweise fand sich mehr an Rack1 gebundene PCK α in den DP-S2849G-GFP A431-Zellen im Vergleich zu den DP-GFP A431-Zellen (Abb. 25). Dies deutet an, dass die erhöhte Sequestrierung von PCK durch

Abbildung 25: DP-S2849G-GFP vermittelt Bindung von Rack1 an PKC

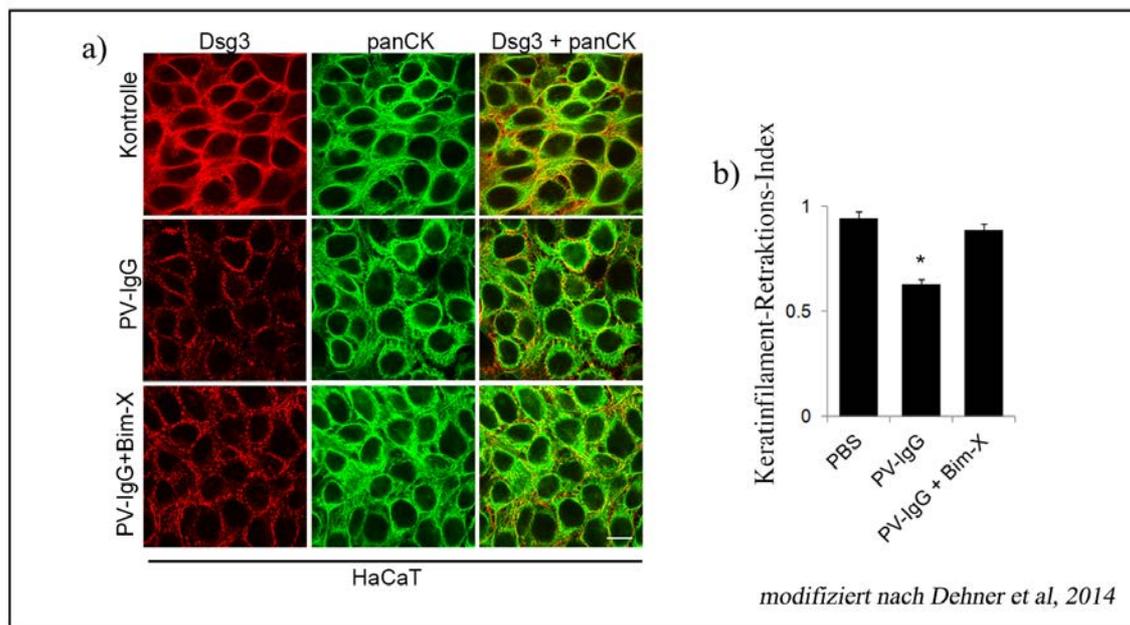


a) Immunpräzipitation von Rack1 in DP-S2849G-GFP exprimierenden A431-Zellen zeigt, dass PKCα-Spiegel im Vergleich zu den DP-GFP-exprimierenden A431-Zellen erhöht sind.
b) Densitometrische Auswertung (n = 3, * p < 0,05 gegenüber DP-GFP).

Rack1 in den DP-S2849G-GFP-Zellen die Erklärung für die gehemmte Phosphorylierung von endogenem DP sein könnte.

Zusätzlich verhindert BIM-X die durch PV-IgG induzierte Keratinfilament-Retraktion (Abb. 26). Zusammen mit den Befunden, dass die phosphodefiziente DP-Mutante die Keratinfilament-Retraktion verhindert, deutet dies an, dass die PKC-abhängige DP-Phosphorylierung verantwortlich für die Keratinfilament-Retraktion bei PV sein könnte.

Abbildung 26: PKC-Inhibition verhindert die Keratinfilament-Retraktion

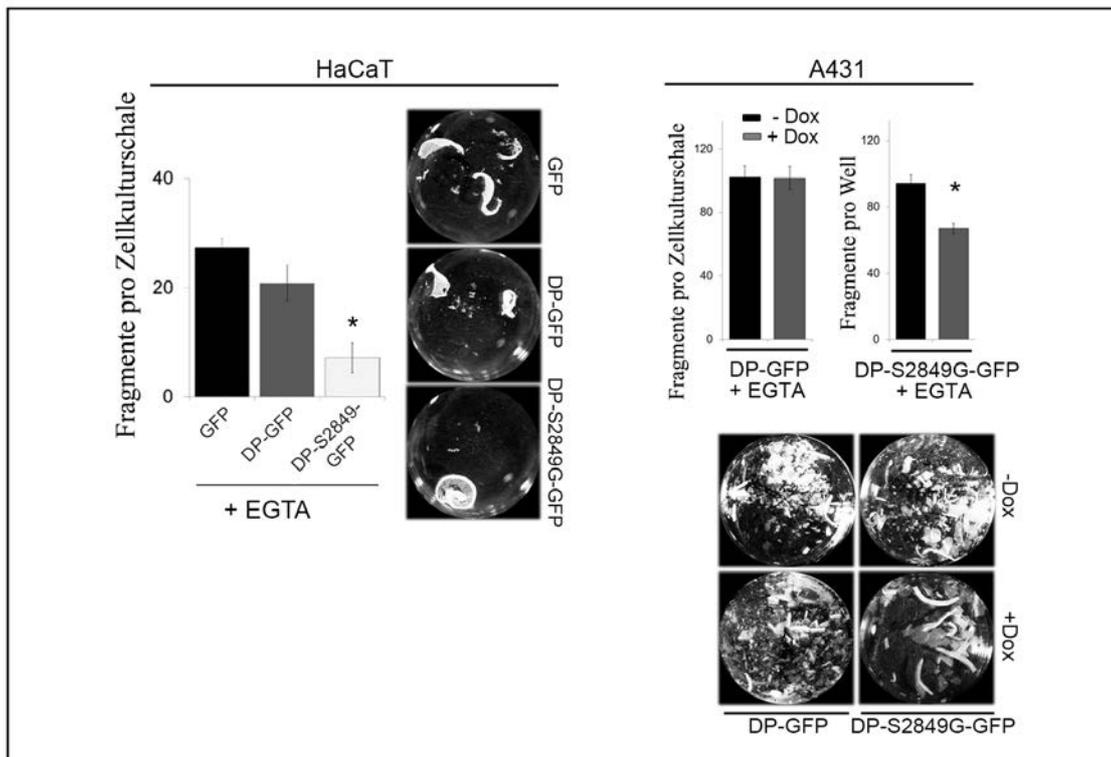


a) In dieser Immunfluoreszenz wird deutlich, dass 24 h PV-IgG-Inkubation von HaCaT-Zellen zu einer Keratinfilament-Retraktion sowie zu einer Fragmentierung der Dsg3-Färbung an der Zellmembran führt. Dieser Effekt kann durch Ko-Inkubation des PKC-Inhibitors BIM-X verhindert werden.
 b) Die statistische Auswertung erfolgte anhand drei verschiedener, unabhängiger Versuche. Es wurden 54 Zellen aus sechs Bildern pro Bedingung analysiert, * $p < 0,05$, Größenmaßstab = 20 μm).

3.9 Einfluss der DP-Mutante auf die desmosomale Hyperadhäsion

Es wurde gezeigt, dass PKC die Hyperadhäsivität von Desmosomen aufhebt [83]. Somit wollten wir final die Hypothese testen, dass PKC dies über eine Phosphorylierung von DP ermöglicht. Um festzustellen, ob die DP-Punktmutation tatsächlich zu hyperadhäsiveren Zellen führte, wurden die Zellen mit der DP-Mutante bzw. dem Kontroll-Konstrukt transfiziert und anschließend für 4 h mit 5 mM EGTA, einem Ca^{2+} -Chelator, inkubiert (Abb. 27). DP-S2849G-GFP führt sowohl in HaCaT-Zellen als auch in A431-Zellen, jeweils verglichen mit den entsprechenden Kontrollkonstrukten bzw. -zelllinien zu signifikant verminderten Fragmentzahlen. Somit sind DP-S2849G-GFP-exprimierende Zellen deutlich resistenter gegen einen Entzug von extrazellulärem Ca^{2+} .

Abbildung 27: Hyperadhäsion durch Expression von DP-S2849G-GFP



Nach 4 h Behandlung mit 5 mmol/l EGTA reduziert sich die Fragmentzahl in den DP-S2849G-GFP-exprimierenden HaCaT- bzw. A431-Zelllinien.
(je n = 6, * p < 0,05 gegenüber entsprechender PBS DP-GFP Kontrolle).

4.Diskussion

4.1 Die Rolle von Pg und DP bei der Kontrolle der p38MAPK-Aktivität

In dieser Arbeit konnte der unterschiedliche Einfluss von Pg und DP auf den p38MAPK-Signalweg herausgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Interaktion zwischen DP, Pg, Dsg3 und p38MAPK. Autoantikörper von PV-Patienten führen zur Aktivierung von p38MAPK, die Teil eines Dsg3-enthaltenden Signalkomplex ist. Diese Aktivierung kann durch ein Dsg-quervernetzendes Tandempeptid abgeschwächt werden. Außerdem reguliert Pg in diesem Komplex die Zelladhäsion via p38MAPK. Es konnte beobachtet werden, dass die Lokalisation von Pg an der Zellmembran wichtig ist, um die p38MAPK-Aktivität zu vermindern und dass Depletion von Pg am Zellhaftungsverlust bei Pemphigus beteiligt zu sein scheint. Im Gegensatz dazu konnte hier kein Zusammenhang zwischen DP und der Regulation von p38MAPK herausgestellt werden.

4.1.1 Pg-Defizienz führt zu p38MAPK-vermitteltem Zellhaftungsverlust

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Menge von Pg an der Membran durch PV-Antikörper beeinflusst werden. Dies stimmt im Falle von Pg mit vorbeschriebenen Befunden in primären Zellen überein [84]. Auch für DP gibt es Studien, die von einer möglichen Depletion durch Autoantikörper-Inkubation [68] sprechen. Dennoch ist es aber bisher unklar, ob eine Depletion einer dieser Proteine eine Ursache für den Zellhaftungsverlust bei Pemphigus ist, oder ob die Depletion vielmehr eine Folge des Haftungsverlusts durch Störung der Dsg3-Funktion sein könnte. In diesem Kontext passt, dass Pg und Dsg3 nach Autoantikörperbindung gemeinsam internalisiert werden [85]. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die verminderten Pg-Menge nach PV-IgG-Gabe zu einer Aktivierung von p38MAPK und weiter zur Retraktion der Zytokeratinfilamente und zum Haftungsverlust zu führen scheint. Andere Studien [86] in Pg-defizienten neonatalen Mauskeratinozyten hingegen zeigen, dass Pg notwendig sei, um einen durch PV-Antikörper hervorgerufenen Zelladhäsionsverlust herbeizuführen. Interessanterweise wurde dann aber später von der gleichen Arbeitsgruppe postuliert, dass Pg zusammen mit Dsg3 in dem Autoantikörper-vermittelten Haftungsverlust involviert sei [69]. Offen bleibt hier die Frage, inwiefern Kompensationsmechanismen wie die Hochregulation anderer Proteine, z.B. von β -catenin [18] im „Knock-Down“-Modell eine Rolle spielen und den Unterschied zu unseren Versuchen erklären könnten.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass Depletion von DP hingegen zwar zum Haftungsverlust führt, dieser scheint jedoch unabhängig von p38MAPK-Aktivierung stattzufinden. Auch eine Keratinfilament-Retraktion findet sich unter dieser Bedingung nicht. Diese Arbeit zeigt, dass Pemphigus-Antikörper zu einer Phosphorylierung von DP an S2849 führen. Dieser Befund und weitere Studien [72], [87] zeigen, dass eine Inhibition von PKC, sowie die Expression einer phosphodefizienten DP-Mutante an S2849 unter anderem den Haftungsverlust verhindern können, was vermuten lässt, dass DP überwiegend durch PKC reguliert wird.

4.1.2 Pg-Defizienz führt zu p38MAPK-vermittelter Keratinfilament-Retraktion

Eine sehr wichtige Rolle für die Zellhaftung scheint die feste Keratinfilament-Verankerung im Desmosom zu spielen. Unsere Daten zeigen, dass Pg-Defizienz zum p38MAPK-vermittelten Keratinfilamentkollaps führt.

Es gibt Studien, die eine definierte Anordnung von Cadherinmolekülen, PKP und DP und deren Interaktionsmuster mit den Intermediärfilamenten vorschlagen [88] [89]. Hier ist Pg ein zentrales Protein, welches am Beginn der Sequenz steht und somit essentiell für die Verankerung des desmosomalen Plaques am Zytokeratinfilament-Netzwerk ist. Ein eher funktionelles Modell zeigt, wie Keratinfilamente selbst dazu in der Lage sind, die PKC-vermittelte DP-Phosphorylierung zu hemmen und somit Zelladhäsion zu fördern [90], was somit den Schluss zulässt, dass Keratinfilamente selbst eine wichtige regulatorische Komponente sind und nicht nur eine statische Verankerungsfunktion besitzen. Besonders interessant ist, dass die DP-Depletion nicht zur Keratinfilament-Retraktion führte. Die einfachste Erklärung ist, dass andere Proteine wie PKP auch eine Verankerung an den Intermediärfilamenten gewährleisten können. Unter zellfreien Bedingungen wurde diese Interaktion auch beschrieben [91].

4.1.3 Pg an der Membran ist protektiv in PV und ist für die Rekrutierung von p38MAPK wichtig

Vorherige Studien zur Lokalisation von Pg und dessen Relevanz für die Pemphigus-Pathogenese haben unter anderem gezeigt, dass die Bindung von Autoantikörpern zu

einer Verminderung von nukleärem Pg und in Folge dessen zu einer vermehrten TCF/LEF-abhängigen Proliferation sowie zum Zelladhäsionsverlust führt [69].

Unsere Daten zeigen eine protektive Wirkung für Pg nur bei Lokalisation außerhalb des Zellkerns, da die Überexpression von extranukleärem Pg im Gegensatz zu nukleärem Pg ausreicht um den Haftungsverlust durch die Autoantikörper zu hemmen. Somit scheint nukleäres Pg in unserem Modell keine protektive Rolle zu haben, weder für die Zellhaftung noch im Hinblick auf die Keratinfilament-Retraktion. Mechanistisch scheint das extranukleäre Pg durch Hemmung der p38MAPK-induzierten Keratinfilament-Retraktion die Zellhaftung zu verbessern. Interessanterweise findet sich nach Depletion von Pg weniger p38MAPK am Desmosom lokalisiert. Dies lässt vermuten, dass Pg als wichtiges Strukturprotein dienen könnte, um p38MAPK direkt oder indirekt am Desmosom zu verankern.

Für die Pemphiguspathogenese könnte dies bedeuten, dass p38MAPK sehr schnell nach Autoantikörper-Bindung in einem Komplex mit Dsg3 und Pg aktiviert wird. Somit ist es möglich, dass die p38MAPK nach initialer Phosphorylierung in diesem Komplex durch die Depletion von Pg ins Zytosol diffundiert, um dort weitere Signalwege zu aktivieren [79]. Hier ist primär die MK2-(MAPKAP-Kinase 2) sowie das von Hitze-Schock-Protein HSP27 [64] zu nennen. HSP27 wird unter Hitzeeinwirkung innerhalb weniger Sekunden von p38MAPK phosphoryliert was zu einer konformationellen Veränderung führt und somit in erhöhter Stabilität des Intermediärfilamentnetzwerkes resultiert [92].

Zusammenfassend zeigen diese Daten für Pg eine wichtige Rolle in einem Dsg3-abhängigen Signalkomplex, indem es p38MAPK bindet, diese inhibiert und dadurch die Zellhaftung durch Modulation des Keratinfilament-Netzwerkes verstärkt.

4.2 Die Rolle einer DP-Punktmutante für die Zellhaftung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch Verminderung von DP zu einem Zellhaftungsverlust führt. Dies wird jedoch nicht durch p38MAPK vermittelt.

Allerdings ist auch dieses Molekül für die Desmosomen-vermittelte Haftung, insbesondere auch bei PV von Bedeutung, da eine Mutation, die eine erhöhte

Keratinfilament-Bindung wie DP-S2849G-GFP induziert, positive Wirkungen auf den Zellhaftungsverlust und Keratinfilament-Retraktion haben. Außerdem führt diese Punktmutation zur Ausbildung eines Ca^{2+} -unabhängigen, hyperadhäsiven Zustand, welcher sowohl die Dsg3-Depletion als auch die durch PV-IgG vermittelte DP-Phosphorylierung verhindern kann.

4.2.1 Hemmung der PKC-abhängigen DP-Phosphorylierung verbessert den Zellhaftungsverlust bei Pemphigus

Ein wichtiger Mechanismus in der Pemphigus-Pathogenese ist die Internalisierung und Depletion von Dsg3 durch Pemphigus-Antikörper [72, 93, 94]. Wie genau diese Depletion funktioniert ist aber noch nicht vollständig bekannt. Es wurde bereits in vorherigen Studien gezeigt, dass PKC durch PV-IgG aktiviert wird [70], noch nicht vollständig klar war aber wie die PKC-Aktivität mit der verminderten Zellhaftung zusammenhängt.

Eine Studie zeigte, dass es durch PV-IgG zu einer Phosphorylierung von Dsg3 via PKC kommt [95], was vermuten lässt, dass diese Phosphorylierung eine Voraussetzung für die darauffolgende Internalisierung sein könnte. Ein weiterer möglicher Zusammenhang zur PKC-Aktivierung könnte die DUR (Desmoglein Unique Region) darstellen, da diese die Internalisierung von Dsg2 reguliert und somit die Vermutung nahelegt, dass eines der wichtigen Ziele von PKC in dieser Region liegt [96].

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es PKC-abhängig zu einer DP-Phosphorylierung durch PV-IgG kommt. Dies deutet an, dass die Phosphorylierung desmosomaler Moleküle einen generellen Mechanismus des Haftungsverlusts darstellt.

Die Immunpräzipitationsversuche mit dem Phosphoserin-Antikörper zeigen, dass Zellen, die stabil mit DP2849G-GFP transfiziert sind, sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach PV-IgG-Behandlung eine drastisch verringerte DP-Phosphorylierung aufweisen. Außerdem hemmt die Mutante die Dsg3-Depletion z.B. in der die Desmosomen enthaltenden Zytoskelett-verankerten Proteinfraction. Daraus lässt sich schließen, dass die DP-Phosphorylierung und die Dsg3-Depletion bei Pemphigus zwei miteinander verknüpfte Vorgänge sind, die beide durch PKC vermittelt werden. Dazu passen auch die Ergebnisse einiger Studien, die zeigen, dass PKC-

Inhibitoren in-vitro wie in-vivo die Blasenbildung hemmen können [72, 97]. Solche Ergebnisse könnten sich als wertvoll erweisen, da hiermit mögliche Ansatzpunkte für die spezifische Behandlung dieser Autoimmunerkrankung geschaffen werden könnten.

Des Weiteren zeigt diese Arbeit, dass DP-S2849G-GFP die endogene DP-Phosphorylierung unterdrückt. In Übereinstimmung mit den Daten vorheriger Studien, dass das PKC-Gerüstmolekül Rack1 PKC- α an den Keratinfilamenten sequestrieren kann, zeigt diese Arbeit, dass die reduzierte Menge an phosphoryliertem DP das Ergebnis einer verstärkten PKC-Sequestrierung darstellen könnte. Dies legen Immunpräzipitationsversuche von Rack1 nahe, die erhöhte Spiegel der PKC- α in den mit der DP-Mutante transfizierten Zellen im Vergleich zum Wildtyp zeigten.

DP und seine Funktion als Verbindungsprotein zu den Intermediärfilamenten sind unabdingbar für starke Adhäsion zwischen den Keratinozyten. Dazu passend stellen unsere Daten heraus, dass das DP-S2849G-GFP Konstrukt, welches eine 9-fach erhöhte Keratinfilament-Verankerung mit sich bringt [98], auch tatsächlich zu einer besseren Zellhaftung führt. Eine vorherige Studie zeigte, dass diese Mutante zu einem Ca^{2+} -unabhängigen Adhäsion der Zellen führt, was von einer weiteren Gruppe durch ein mögliches Zusammenlagern zwischen DP, Pkp1 und Dsg3 erklärt wurde, und schlussendlich in hyperadhäsiven Desmosomen resultierte [99]. Hobbs et al. zeigen damit, dass schon der Austausch einer einzelnen Aminosäure ausreicht, um diesen Zustand der Ca^{2+} -Unabhängigkeit und damit Hyperadhäsivität zu bewirken. Somit wird auch deutlich wie wichtig die DP-Phosphorylierung für die Regulation der Zellhaftung zu sein scheint.

4.2.2 Keratinfilamente regulieren die desmosomale Haftung

Es gibt Ergebnisse, die hervorheben, dass es die Keratinfilamente selbst sind, die die PKC-abhängige DP-Phosphorylierung im Desmosom regulieren [90]. Man geht davon aus, dass das Ablösen desmosomaler Moleküle von diesen Intermediär-filamenten einen zentralen Vorgang im Rahmen des Haftungsverlusts darstellt. Diese Arbeit zeigt, dass DP-S2849G-GFP, ähnlich wie die Hemmung der PKC in Keratinozyten, denen alle Keratinfilamente fehlen, den Haftungsverlust vermindern kann [90]. Somit besitzen Keratinfilamente nicht nur eine wichtige Funktion als Stabilisatoren der Zelladhäsion

innerhalb der desmosomalen Plaques, sie regulieren außerdem somit die DP-Phosphorylierung via PKC. Dies scheint eine Bedingung für die Dsg3-Depletion zu sein und ist somit ein zentraler Mechanismus in der Regulation des kontinuierlich ablaufenden Auf- und Abbaus der Desmosomen.

Die Daten in dieser Arbeit zeigen, dass die Desmosomen von Keratinozyten nach Überexpression von DP-S2849G-GFP in einen hyperadhäsiven Zustand übergehen und somit Ca^{2+} -insensitiv sind. Dies scheint als Schutz vor Autoantikörpern zu fungieren, da es zu signifikant höheren Dsg3-Mengen innerhalb des Desmosoms kommt und sowohl die Dsg3-Depletion im Desmosom als auch die Zytokeratin-Retraktion durch PV-IgG effizient geblockt werden kann.

4.3 Ausblick

Pemphigus vulgaris ist eine seltene jedoch ohne Behandlung tödliche Autoimmunerkrankung. Ein Vorteil ist jedoch, dass die pathogene Bedeutung der Autoantikörper gegen die desmosomalen Cadherine Dsg1 und Dsg3 bekannt ist, so dass sie sich für die Grundlagenforschung anbietet. Dennoch haben die bisherigen Kenntnisse nicht zu spezifischeren Behandlungsmethoden geführt, welche über unspezifische Immunsuppression hinausreichen.

Die Daten dieser Arbeit unterstreichen die zentrale Bedeutung der beiden Signalwege, PKC und p38MAPK, in der Pathogenese von Pemphigus vulgaris. Beide Moleküle interagieren mit dem Desmosom: p38MAPK ist mit Dsg3 verbunden und wird infolge von Autoantikörper-Bindung aktiviert, ein Prozess der unter anderem durch EGFR-Aktivierung und Inhibition von RhoA letztendlich zur Retraktion der Keratinfilamente führt. Zeitgleich führt die Aktivierung von PKC, welche über RACK1 an den Keratinfilamenten hängt, zu einer verminderten Bindung dieser an DP, was wiederum die Dsg3 Bindung an das Keratinnetzwerk beeinflusst. Es ist anzunehmen, dass beide Mechanismen eine wichtige Rolle in der Regulation der Zelladhäsion spielen, insbesondere wenn die Integrität der Haut betroffen ist. Möglicherweise sind beide Signalmoleküle am Reifungsprozess des Desmosoms beteiligt, indem sie sowohl das Keratinfilamentnetzwerk als auch desmosomale Proteine modifizieren, sodass die Desmosomen Ca^{2+} -insensitiv werden. Diese damit hyperadhäsiven Desmosomen unterliegen einer geringeren Umstrukturierung, welches damit Schutz vor der

Autoantikörper-vermittelten Depletion von Dsg3 bietet. Der Zusammenhang dieser Prozesse ist wichtig für das Verständnis der Pathogenese von Pemphigus, da somit neue Möglichkeiten für zielgerichtete Therapien gefunden werden können. Eine weitere noch ausstehende Frage ist, wie es nach Depletion von DP zum Haftungsverlust kommt – Phosphorylierung von DP scheint ein Mechanismus zu sein. Ob und wie die DP-Phosphorylierung mit der Depletion von Dsg3 in Zusammenhang steht, bleibt eine weitere offene Frage.

4.4 Zusammenfassung

Desmosomen sind wichtige Zellkontakte zur Sicherstellung eines stabilen Zell-Zell-Kontakts. Insbesondere in Geweben, die einer andauernden und starken mechanischen Belastung ausgesetzt sind, sind Desmosomen von entscheidender Bedeutung und eine Störung dieser Funktion führt zu schwerwiegenden Folgen. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die blasenbildende Hauterkrankung Pemphigus vulgaris, bei welcher Autoantikörper gegen die Haftmoleküle Dsg1 und Dsg3 eine Rolle spielen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Plaqueproteinen DP und Pg und sie untersucht Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Bedeutung beider Proteine im Rahmen der Pathogenese des Pemphigus.

Für Pg zeigte sich eine zentrale Position innerhalb eines Komplexes mit dem desmosomalen Cadherin Dsg3 und p38MAPK. Die p38MAPK kann durch ihre Aktivierung zu Zellhaftungsverlust führen und somit für Störung der Zytokeratinanordnung verantwortlich sein. Pg spielt eine wichtige Rolle, da Depletion von Pg allein ausreichend, ist um p38MAPK zu aktivieren und somit zu Zellhaftungsverlust und zur Keratinfilament-Retraktion führen kann, die als bei Pemphigus als wichtiges Phänomen angesehen wird

Hierbei scheint an den Zellkontakten lokalisiertes Pg entscheidend zu sein, während nukleär lokalisiertes Pg hierbei keine Rolle spielt.

Depletion von DP hingegen führt zwar zu Haftungsverlust, jedoch ist dieser unabhängig von p38MAPK. Ebenso kam es nicht zu einer Zytokeratinfilament-Retraktion nach DP-Reduktion, ein weiterer Hinweis, dass der Mechanismus des Zellhaftungsverlusts hier ein anderer zu sein scheint.

Trotzdem scheint DP als Ziel der PKC bei Pemphigus wichtig zu sein. PV-IgG-vermittelte DP-Phosphorylierung war abhängig von PKC, Hemmung dieser Kinase oder Expression einer phosphorylierungsdefizienten DP-Mutante war protektiv und führte zu verstärkter Zellhaftung.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit ein Einblick in die Funktion zweier desmosomaler Plaque-Proteine und deren Rolle bei der Pemphigus-Pathogenese gewonnen werden. Somit wurden neue Mechanismen dargestellt, wie die Autoantikörper bei Pemphigus nach der Bindung an desmosomale Cadherine zum Zellhaftungsverlust führen. Diese Erkenntnisse könnten eine Grundlage für die Entwicklung einer spezifischen Therapie des Pemphigus darstellen.

5. Bibliographie

5.1 Originalpublikationen

1. Lüllmann-Rauch, R. and F. Paulsen, *Taschenlehrbuch Histologie*. 2012: Thieme.
2. Welsch, U., T. Deller, and W. Kummer, *Lehrbuch Histologie mit 49 Tabellen*. 4. Aufl. ed. 2014, München: Elsevier. X, 699 S.
3. Waschke, J., *The desmosome and pemphigus*. *Histochem Cell Biol*, 2008. **130**(1): p. 21-54.
4. Awad, M.M., et al., *DSG2 mutations contribute to arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy*. *Am J Hum Genet*, 2006. **79**(1): p. 136-42.
5. Hartlieb, E., et al., *Desmoglein 2 compensates for desmoglein 3 but does not control cell adhesion via regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in keratinocytes*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(24): p. 17043-53.
6. Koch, P.J., et al., *Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris*. *J Cell Biol*, 1997. **137**(5): p. 1091-102.
7. Kljuic, A., et al., *Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris*. *Cell*, 2003. **113**(2): p. 249-60.
8. Whittock, N.V. and C. Bower, *Genetic evidence for a novel human desmosomal cadherin, desmoglein 4*. *J Invest Dermatol*, 2003. **120**(4): p. 523-30.
9. Harrison, O.J., et al., *Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(26): p. 7160-5.
10. Spindler, V., et al., *Desmocollin 3-mediated binding is crucial for keratinocyte cohesion and is impaired in pemphigus*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(44): p. 30556-64.
11. Pfeiffer, D., et al., *[Age-related differences and changes in clinical aspects and follow-up of cervix cancer since 1973]*. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 1992. **52**(2): p. 81-7.
12. Pfeiffer, S., et al., *Producing cells retain and recycle Wingless in Drosophila embryos*. *Curr Biol*, 2002. **12**(11): p. 957-62.
13. Huber, O., M. Krohn, and R. Kemler, *A specific domain in alpha-catenin mediates binding to beta-catenin or plakoglobin*. *J Cell Sci*, 1997. **110 (Pt 15)**: p. 1759-65.
14. Chitaev, N.A., et al., *The binding of plakoglobin to desmosomal cadherins: patterns of binding sites and topogenic potential*. *J Cell Biol*, 1996. **133**(2): p. 359-69.
15. Wahl, J.K., et al., *Plakoglobin domains that define its association with the desmosomal cadherins and the classical cadherins: identification of unique and shared domains*. *J Cell Sci*, 1996. **109 (Pt 5)**: p. 1143-54.
16. Witcher, L.L., et al., *Desmosomal cadherin binding domains of plakoglobin*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(18): p. 10904-9.
17. Kowalczyk, A.P., et al., *The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters desmosomal cadherin-plakoglobin complexes*. *J Cell Biol*, 1997. **139**(3): p. 773-84.
18. Bierkamp, C., et al., *Desmosomal localization of beta-catenin in the skin of plakoglobin null-mutant mice*. *Development*, 1999. **126**(2): p. 371-81.
19. Ruiz, P., et al., *Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart*. *J Cell Biol*, 1996. **135**(1): p. 215-25.
20. Protonotarios, N. and A. Tsatsopoulou, *Naxos disease: cardiocutaneous syndrome due to cell adhesion defect*. *Orphanet J Rare Dis*, 2006. **1**: p. 4.
21. McKoy, G., et al., *Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease)*. *Lancet*, 2000. **355**(9221): p. 2119-24.

22. Barker, N., P.J. Morin, and H. Clevers, *The Yin-Yang of TCF/beta-catenin signaling*. Adv Cancer Res, 2000. **77**: p. 1-24.
23. Polakis, P., *Wnt signaling and cancer*. Genes Dev, 2000. **14**(15): p. 1837-51.
24. Huelsken, J. and J. Behrens, *The Wnt signalling pathway*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 21): p. 3977-8.
25. Bass-Zubek, A.E., et al., *Plakophilin 2: a critical scaffold for PKC alpha that regulates intercellular junction assembly*. J Cell Biol, 2008. **181**(4): p. 605-13.
26. Wolf, A., et al., *Plakophilin 1 stimulates translation by promoting eIF4A1 activity*. J Cell Biol, 2010. **188**(4): p. 463-71.
27. Gerull, B., et al., *Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*. Nat Genet, 2004. **36**(11): p. 1162-4.
28. Angst, B.D., L.A. Nilles, and K.J. Green, *Desmoplakin II expression is not restricted to stratified epithelia*. J Cell Sci, 1990. **97** (Pt 2): p. 247-57.
29. Ruhrberg, C. and F.M. Watt, *The plakins family: versatile organizers of cytoskeletal architecture*. Curr Opin Genet Dev, 1997. **7**(3): p. 392-7.
30. Norman, M., et al., *Novel mutation in desmoplakin causes arrhythmogenic left ventricular cardiomyopathy*. Circulation, 2005. **112**(5): p. 636-42.
31. Hobbs, R.P., et al., *Insights from a desmoplakin mutation identified in lethal acantholytic epidermolysis bullosa*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(11): p. 2680-3.
32. Gallicano, G.I., C. Bauer, and E. Fuchs, *Rescuing desmoplakin function in extra-embryonic ectoderm reveals the importance of this protein in embryonic heart, neuroepithelium, skin and vasculature*. Development, 2001. **128**(6): p. 929-41.
33. Shungin, D., et al., *New genetic loci link adipose and insulin biology to body fat distribution*. Nature, 2015. **518**(7538): p. 187-96.
34. Gallicano, G.I., et al., *Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage*. J Cell Biol, 1998. **143**(7): p. 2009-22.
35. Gu, L.H. and P.A. Coulombe, *Keratin expression provides novel insight into the morphogenesis and function of the companion layer in hair follicles*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(5): p. 1061-73.
36. Moll, R., M. Divo, and L. Langbein, *The human keratins: biology and pathology*. Histochem Cell Biol, 2008. **129**(6): p. 705-33.
37. Tsang, S.M., et al., *Desmoglein 3 acting as an upstream regulator of Rho GTPases, Rac-1/Cdc42 in the regulation of actin organisation and dynamics*. Exp Cell Res, 2012. **318**(18): p. 2269-83.
38. Stanley, J.R. and M. Amagai, *Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome*. N Engl J Med, 2006. **355**(17): p. 1800-10.
39. Langan, S.M., et al., *Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study*. BMJ, 2008. **337**: p. a180.
40. Prajapati, V. and P.R. Mydlarski, *Advances in pemphigus therapy*. Skin Therapy Lett, 2008. **13**(3): p. 4-7.
41. Burg, G., et al., *From inflammation to neoplasia: mycosis fungoides evolves from reactive inflammatory conditions (lymphoid infiltrates) transforming into neoplastic plaques and tumors*. Arch Dermatol, 2001. **137**(7): p. 949-52.
42. Rafei, D., et al., *IgG autoantibodies against desmocollin 3 in pemphigus sera induce loss of keratinocyte adhesion*. Am J Pathol, 2011. **178**(2): p. 718-23.
43. Kamiya, K., et al., *Atypical pemphigus with immunoglobulin G autoantibodies against desmoglein 3 and desmocollin 3*. J Dermatol, 2015.
44. Nguyen, V.T., A. Ndoye, and S.A. Grando, *Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity*. Am J Pathol, 2000. **157**(4): p. 1377-91.
45. Sajda, T., et al., *Multiplexed autoantigen microarrays identify HLA as a key driver of anti-desmoglein and -non-desmoglein reactivities in pemphigus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(7): p. 1859-64.

46. Marchenko, S., et al., *Antimitochondrial autoantibodies in pemphigus vulgaris: a missing link in disease pathophysiology*. J Biol Chem, 2010. **285**(6): p. 3695-704.
47. Steinbrink, K., *Facharztprüfung Dermatologie und Venerologie*. 2014.
48. Kneisel, A. and M. Hertl, *Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations*. J Dtsch Dermatol Ges, 2011. **9**(10): p. 844-56; quiz 857.
49. Altmeyer, P., *Therapielexikon Dermatologie und Allergologie*. 2013.
50. Röcken, M., et al., *Taschenatlas Dermatologie: Grundlagen, Diagnostik, Klinik*. 2010: Thieme.
51. Buchta, M., et al., *Das zweite StEx: Basiswissen Klinische Medizin für Examen und Praxis*. 2013: Springer Berlin Heidelberg.
52. Rahbar, Z., et al., *Pemphigus disease activity measurements: pemphigus disease area index, autoimmune bullous skin disorder intensity score, and pemphigus vulgaris activity score*. JAMA Dermatol, 2014. **150**(3): p. 266-72.
53. Zakka, L.R., S.S. Shetty, and A.R. Ahmed, *Rituximab in the treatment of pemphigus vulgaris*. Dermatol Ther (Heidelb), 2012. **2**(1): p. 17.
54. Joly, P., et al., *First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open-label randomised trial*. Lancet, 2017. **389**(10083): p. 2031-2040.
55. Kneisel, A. and M. Hertl, *Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: diagnosis and therapy*. J Dtsch Dermatol Ges, 2011. **9**(11): p. 927-47.
56. Tsunoda, K., et al., *Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 2170-8.
57. Heupel, W.M., et al., *Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction*. J Immunol, 2008. **181**(3): p. 1825-34.
58. Waschke, J., et al., *Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3157-65.
59. Vielmuth, F., J. Waschke, and V. Spindler, *Loss of Desmoglein Binding Is Not Sufficient for Keratinocyte Dissociation in Pemphigus*. J Invest Dermatol, 2015. **135**(12): p. 3068-77.
60. Payne, A.S., et al., *Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(5): p. 536-43.
61. Mahoney, M.G., et al., *Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris*. J Clin Invest, 1999. **103**(4): p. 461-8.
62. Galichet, A., L. Borradori, and E.J. Muller, *A new light on an old disease: adhesion signaling in pemphigus vulgaris*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(1): p. 8-10.
63. Berkowitz, P., et al., *Autoantibodies in the autoimmune disease pemphigus foliaceus induce blistering via p38 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling in the skin*. Am J Pathol, 2008. **173**(6): p. 1628-36.
64. Berkowitz, P., et al., *Induction of p38MAPK and HSP27 phosphorylation in pemphigus patient skin*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(3): p. 738-40.
65. Spindler, V., et al., *Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering*. J Clin Invest, 2013. **123**(2): p. 800-11.
66. Waschke, J. and V. Spindler, *Desmosomes and extradesmosomal adhesive signaling contacts in pemphigus*. Med Res Rev, 2014. **34**(6): p. 1127-45.
67. Mao, X., et al., *MAPKAP kinase 2 (MK2)-dependent and -independent models of blister formation in pemphigus vulgaris*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(1): p. 68-76.
68. Saito, M., et al., *Signaling dependent and independent mechanisms in pemphigus vulgaris blister formation*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e50696.
69. Williamson, L., et al., *Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin*. EMBO J, 2006. **25**(14): p. 3298-309.

70. Osada, K., M. Seishima, and Y. Kitajima, *Pemphigus IgG Activates and Translocates Protein Kinase C from the Cytosol to the Particulate/Cytoskeleton Fractions in Human Keratinocytes*. J Invest Dermatol, 1997. **108**(4): p. 482-487.
71. Sánchez-Carpintero, I., et al., *In vivo blockade of pemphigus vulgaris acantholysis by inhibition of intracellular signal transduction cascades*. British Journal of Dermatology, 2004. **151**(3): p. 565-570.
72. Spindler, V., et al., *The Extent of Desmoglein 3 Depletion in Pemphigus Vulgaris Is Dependent on Ca²⁺-Induced Differentiation: A Role in Suprabasal Epidermal Skin Splitting?* Am J Pathol, 2011. **179**(4): p. 1905-1916.
73. Zarubin, T. and J. Han, *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway*. Cell Res, 2005. **15**(1): p. 11-8.
74. Berkowitz, P., et al., *p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(34): p. 12855-60.
75. Roux, P.P. and J. Blenis, *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 320-44.
76. Zhang, S., et al., *Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1*. J Biol Chem, 1995. **270**(41): p. 23934-6.
77. Waschke, J., et al., *Inhibition of Rho A activity causes pemphigus skin blistering*. J Cell Biol, 2006. **175**(5): p. 721-7.
78. Boukamp, P., et al., *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line*. J Cell Biol, 1988. **106**(3): p. 761-71.
79. Berkowitz, P., et al., *Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization*. J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 23778-84.
80. Heupel, W.M., et al., *Endothelial barrier stabilization by a cyclic tandem peptide targeting VE-cadherin transinteraction in vitro and in vivo*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 10): p. 1616-25.
81. Hobbs, R.P. and K.J. Green, *Desmoplakin Regulates Desmosome Hyperadhesion*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(2): p. 482-485.
82. Graness, A., et al., *Protein-tyrosine-phosphatase-mediated epidermal growth factor (EGF) receptor transinactivation and EGF receptor-independent stimulation of mitogen-activated protein kinase by bradykinin in A431 cells*. Biochem J, 2000. **347**(Pt 2): p. 441-7.
83. Garrod, D. and M. Chidgey, *Desmosome structure, composition and function*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(3): p. 572-87.
84. de Bruin, A., et al., *Plakoglobin-dependent disruption of the desmosomal plaque in pemphigus vulgaris*. Exp Dermatol, 2007. **16**(6): p. 468-75.
85. Calkins, C.C., et al., *Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies*. J Biol Chem, 2006. **281**(11): p. 7623-34.
86. Caldelari, R., et al., *A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris*. J Cell Biol, 2001. **153**(4): p. 823-34.
87. Cirillo, N., A. Lanza, and S.S. Prime, *Induction of hyper-adhesion attenuates autoimmune-induced keratinocyte cell-cell detachment and processing of adhesion molecules via mechanisms that involve PKC*. Exp Cell Res, 2010. **316**(4): p. 580-92.
88. Acehan, D., et al., *Plakoglobin is required for effective intermediate filament anchorage to desmosomes*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(11): p. 2665-75.
89. Stahley, S.N., et al., *Molecular organization of the desmosome as revealed by direct stochastic optical reconstruction microscopy*. J Cell Sci, 2016. **129**(15): p. 2897-904.
90. Kröger, C., et al., *Keratins control intercellular adhesion involving PKC- α -mediated desmoplakin phosphorylation*. J Cell Biol, 2013. **201**(5): p. 681-692.

91. Walter, E., et al., *Different signaling patterns contribute to loss of keratinocyte cohesion dependent on autoantibody profile in pemphigus*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 3579.
92. Lavoie, J.N., et al., *Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(1): p. 505-16.
93. Aoyama, Y., M.K. Owada, and Y. Kitajima, *A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes*. Eur J Immunol, 1999. **29**(7): p. 2233-2240.
94. Spindler, V., et al., *Pemphigus IgG Causes Skin Splitting in the Presence of Both Desmoglein 1 and Desmoglein 3*. Am J Pathol, 2007. **171**(3): p. 906-916.
95. Aoyama, Y., M.K. Owada, and Y. Kitajima, *A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes*. Eur J Immunol, 1999. **29**(7): p. 2233-40.
96. Chen, J., et al., *The C-terminal unique region of desmoglein 2 inhibits its internalization via tail-tail interactions*. J Cell Biol, 2012. **199**(4): p. 699-711.
97. Sanchez-Carpintero, I., et al., *In vivo blockade of pemphigus vulgaris acantholysis by inhibition of intracellular signal transduction cascades*. Br J Dermatol, 2004. **151**(3): p. 565-70.
98. Meng, J.J., et al., *Two-hybrid analysis reveals fundamental differences in direct interactions between desmoplakin and cell type-specific intermediate filaments*. J Biol Chem, 1997. **272**(34): p. 21495-503.
99. Tucker, D.K., S.N. Stahley, and A.P. Kowalczyk, *Plakophilin-1 Protects Keratinocytes from Pemphigus Vulgaris IgG by Forming Calcium-Independent Desmosomes*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(4): p. 1033-1043.

6. Abkürzungsverzeichnis

Verwendete Abkürzung

µm
µmol/l

Abb.
ABSIS

AChR
AK23

AP
APS
ARVC

Bim-X
Bp
BSA
bzw.
Ca²⁺
cAMP
CD20
cDNA
cm²

CREB

DEPC
DMEM
DP
Dsc 1
Dsc 2
Dsc 3
Dsg1
Dsg2
Dsg3
DTD
EC
ECL
EDTA
EGF
ELISA

F-Aktin
FCS
g

Bedeutung

Mikrometer
Mikromol pro Liter

Abbildung
Autoimmune bullous skin disorder
intensity score
Acetylcholin-Rezeptor
Monoklonaler Anti-Dsg3-Antikörper
aus einem Pemphigus vulgaris
Mausmodell

Äußerer Plaque
Ammoniumsulfat
Arrhythmogene rechtsventrikuläre
Kardiomyopathie
Bisindolylmaleimid X Hydrochlorid
Basenpaar
Bovines Serumalbumin
beziehungsweise
Calcium-Ion
Cyclisches Adenosinmonophosphat
Cluster of Differentiation 20
Complementary DNA
Quadratzenimeter

cAMP response element binding
protein

Diethylpyrocarbonat
Dulbecco's modified Eagle's Medium
Desmoplakin
Desmocollin 1
Desmocollin 2
Desmocollin 3
Desmoglein 1
Desmoglein 2
Desmoglein 3
Desmoglein Endbereich
Extrazellulärer Cadherin-Bereich
Enhanced chemiluminescence
Ethyldiamintetraessigsäure
Epidermal Growth Factor
Enzyme-Linked Immunosorbent
Assay
Filamentäres Aktin
Fetales Kälberserum
Gramm

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H.E.-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HaCaT	Human low calcium elevated temperature cells
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSP27	Heat shock protein 27
IF	Intermediärfilament
IgG	Immunglobulin G Fraktion
IP	Innerer Plaque
IP3	Inositol - 1,4,5 - triphosphat
kDa	Kilodalton
KIF	Intermediärfilamente
mol/l	Mol pro Liter
mA	Milliampere
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
min	Minute
MK2	MAPK Kinase-activated protein kinase 2
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
mV	Millivolt
MW	Mediumswechsel
NGS	Normales Ziegenserum ("normal goat serum")
nm	Nanometer
PA	Plasminogenaktivator
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. „phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDAI	Pemphigus disease Area index
PF	Pemphigus foliaceus
PFA	Paraformaldehyd
PG	Plakoglobin
PKC	Proteinkinase C
PKP	Plakophilin
PLA	Proximity Ligation Assay
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PPL	Prestained Protein Ladder
PV	Pemphigus vulgaris
PF-IgG	aufgereinigte Immunglobulin-G-Fraktion von Seren von Pemphigus

PV-IgG	foliaceus Patienten aufgereinigte Immunglobulin-G- Fraktion von Seren von Pemphigus vulgaris Patienten
PVAS	Pemphigus vulgaris activity
RUD	Repeat Unit domain
s	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
shRNA	Small hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
Src	Sarcoma (Tyrosinkinase)
Tbl.	Tablette
TCF/LEF	Transkriptionsfaktor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
v/v	Volume per Volume
w/v	Weight per Volume
z.B.	zum Beispiel
ZK	Zytokeratin

7. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Jens Waschke für die großzügige Überlassung dieses Themas bedanken. Dank seiner enthusiastischen Rede bei der Föfole-Vorstellungsveranstaltung gemeinsam mit einer eindrucksvollen Präsentation meines Betreuers Herrn Prof. Dr. med Volker Spindler konnte er mich für dieses Thema gewinnen, welches ich schon bald nicht mehr missen wollte.

Beide schafften es mich gemeinsam durch kontinuierliches Motivieren, konstruktive Kritik und Unterstützung bei Planung und Bearbeitung dieser Arbeit mehr im Labor als irgendwo anders zu halten und letztendlich meine Forschungsbegeisterung zu verstärken.

Des Weiteren möchte ich mich vor allem bei Claudia Mayerhofer, Sabine Mühlshimer, Angelika Antonius und allen späteren technischen Assistentinnen für ihre tolle Unterstützung im Erlernen vieler Methoden und Laborfertigkeiten bedanken.

Ebenso gebührt all meinen Kollegen großer Dank, die mir oft mit Rat und Tat zur Seite standen und immer ein offenes Ohr für mich hatten, so dass ich mich mit vielen in einem mehr freundschaftlichen als nur kollegialen Verhältnis befand. Besonders möchte ich hier Daniela Kugelmann und Franziska Vielmuth nennen, die mich gerade in schwierigeren Zeiten wie dem Staatsexamen neben zweier Manuskript-Revisionen nicht nur ausgehalten sondern immer wieder aufgeheitert haben und sich am Ende sogar meiner Arbeit hier als Korrekturleserinnen angenommen haben.

Zu guter Letzt möchte ich neben vielen weiteren wichtigen Namen wie Frau Kustermann etc., noch Herrn Dr. dr. med Miklós Sárdy nennen, welcher es mir möglich machte Pemphigus, neben vieler weiterer Erkrankungen, auch in klinischen Situationen anzutreffen.

Vielen Dank für alles! Ich hätte mir keine bessere Gruppe und Betreuung wünschen können!



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Carina Dehner

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand